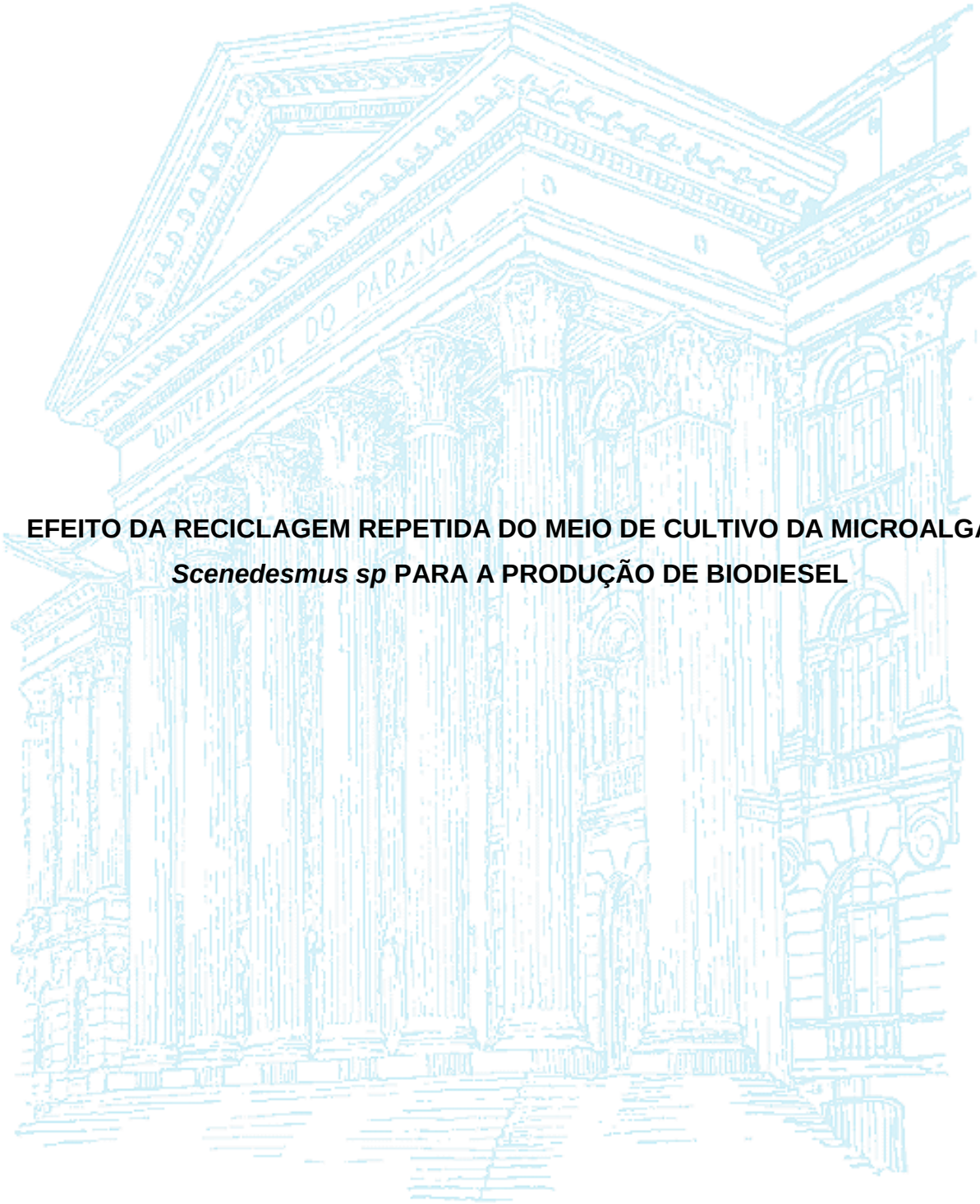
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA JUDITE DZUMAN



EFEITO DA RECICLAGEM REPETIDA DO MEIO DE CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus sp* PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

CURITIBA

2013

MARIA JUDITE DZUMAN

EFEITO DA RECICLAGEM REPETIDA DO MEIO DE CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus sp.* PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. David Alexander Mitchell
Coorientadores: Prof. Dr. André Bellin Mariano e Prof. Dr. Luiz Fernando de Lima Luz Júnior

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

A minha família, fonte de
incentivo e inspiração constante.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria, por este fato, de expressar toda a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta dissertação se tornasse uma realidade. A todos quero manifestar os meus sinceros agradecimentos.

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao Prof. Dr. David Alexander Mitchell pela orientação, amizade, e pela confiança, me dando liberdade e estímulo em todas as minhas decisões.

Aos professores coorientadores, André Bellin Mariano e Luiz Fernando de Lima Luz Júnior pelas orientações durante meu trabalho, apoio e amizade.

À UFPR e ao departamento de Pós-graduação em Engenharia Química, pela oportunidade de realização deste mestrado.

Ao NPDEAS em especial ao professor José Viriato Coelho Vargas, que cedeu o laboratório para realização da pesquisa. As alunas Jacqueline, Maura, Aline e Amanda por toda a ajuda cedida.

Agradeço toda equipe do CEPPA, em especial a minha gerente, Mirian e aos meus colegas de trabalho, Valdirene, Eriel, Elaine e Yeda por toda ajuda concedida e a Coordenadora Cristina, pela amizade e dicas de trabalho.

Aos colegas, Thiago e Erika Vasques, por toda ajuda e dedicação.

Ao meu esposo Sérgio Heuko, pelo apoio e estimulo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais Davi e Ana, os meus agradecimentos.

Deixo aqui meu muito obrigado.

“Todo futuro es fabuloso.”

Alejo Carpentier

RESUMO

O biodiesel surge como uma alternativa de grande potencial por ser obtido a partir de fontes renováveis, tais como mamona, dendê (palma), girassol, babaçu, amendoim, pinhão manso, soja e gorduras animais, sendo considerado um combustível biodegradável. Quando utilizado óleo vegetal de plantas oleaginosas na produção do biodiesel, o custo da matéria-prima varia em torno de 70% - 85% do custo total da produção. Outra desvantagem da utilização de plantas oleaginosas é a ocupação de terras férteis, que faz com que a produção de biodiesel concorra com a produção de alimentos. Portanto a matéria-prima utilizada atualmente pode ser substituída por biomassa de microalgas. A biomassa de microalgas tem o potencial de ser convertido em biodiesel. No entanto, o custo de produção da biomassa de microalgas é alto. Este custo da produção de microalgas está diretamente relacionado com a aquisição dos nutrientes que compõem o meio de cultivo. Assim, desenvolver um sistema de reutilização do meio de cultivo permite reduzir o custo da produção de microalgas, pois, são aproveitados o meio aquoso e os nutrientes que não foram consumidos pelas microalgas durante o cultivo anterior. Neste sentido, esta pesquisa buscou avaliar o efeito da reciclagem repetida do meio de cultivo sobre o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. Para tanto, a microalga foi cultivada em meio sintético *Chu* durante 10 dias, após o período de cultivo a biomassa foi recuperada por sedimentação e o sobrenadante (meio clarificado) foi utilizado para fornecer 50% do volume no cultivo posterior o meio padrão (meio *Chu*) foi utilizado para completar os outros 50%. O meio de cultivo foi reciclado três vezes consecutivamente e o efeito da reciclagem foi avaliado através de densidade óptica a 540nm, produtividade de biomassa, lipídeos totais e perfil lipídico. Também foi quantificado o consumo de nitrato, fosfato, ferro e potássio, comparando com o cultivo realizado em meio padrão, o cultivo realizado com o meio reciclado teve maior produtividade de biomassa e lipídeos nos três reciclos realizados. Em relação ao perfil lipídico, o reciclo apresentou 9,8% de ácidos graxos poli-insaturados quando comparado com o meio padrão que foi de 23,7%, o resultado encontrado para o meio reciclado representa uma melhora na qualidade do biodiesel. Durante o período de cultivo, a microalga consome mais que 99% do nitrato, entre 10% a 30% de fosfato, 23% a 91% de ferro total e 1% a 19% de potássio fornecido. Após o período de cultivo no meio reciclado a concentração de biomassa seca ficou em média 600 mg L^{-1} e o teor de lipídeos 15%, enquanto para o cultivo realizado com o meio padrão a biomassa ficou em média 500 mg L^{-1} e o teor de lipídeos 11%. A reciclagem repetida do meio de cultivo (3 reciclos) permite reduzir o custo do meio em 34% para uma planta de produção de microalgas.

Palavras-chave: biodiesel; microalga; reutilização do meio de cultivo.

ABSTRACT

Biodiesel is currently being promoted as an biodegradable alternative to petrodiesel, given that it is produced from renewable resources such as castor oil, palm oil (palm), sunflower, babassu oil, peanut, jatropha, soy and animal. Currently, the greater part of biodiesel is produced using oil from oleaginous plants as the feedstock. However, the use of oil crops has two disadvantages. Firstly, this raw material contributes 70 to 85% of the total cost of the biodiesel produced from it. Secondly, producing biodiesel from oil crops reduces the fertile land available for food production. The latter problem could be avoided by producing the oil for biodiesel using microalgae, which can be cultivated using land that is not appropriate for the cultivation of food crops. However, the costs of producing microalgal biomass are high. Since acquisition of nutrients for the culture medium contributes a significant proportion of the costs of growing microalgae, it would be advantageous to reutilize the culture medium, taking advantage of nutrients that are not consumed during the previous culture. This idea was tested in the current work by evaluating the growth of the microalgae *Scenedesmus* sp. during repeated recycles of the culture medium. This microalgae was cultivated in Chu medium for 10 days, after which the biomass was recovered by sedimentation and the clarified medium was used to provide 50% of the medium volume in the subsequent culture. Standard Chu medium was used to provide the other 50% of the volume. This recycle procedure was done three times consecutively. Culture performance was evaluated on the basis of the optical density at 540 nm, the productivity of biomass, the total lipids and the composition of the lipids produced. The consumption of nitrate, phosphate, iron and potassium during each cycle was also determined. In comparison to a culture undertaken in Chu medium, the cultures with recycle had a higher productivity of both biomass and lipids. The lipids produced in the cultures with recycle had a proportion of polyunsaturated fatty acids, 9.8% of when compared to the standard medium was 23.7%, which would lead to a better quality biodiesel. During the cultivation consumes over 99% of the nitrate, between 10% and 30% phosphate, 23% to 91% of total iron and 1% to 19% of potassium provided. For the cultures undertaken with recycled medium, the average dry biomass concentration was 600 mg $L^{-1}$and the lipid content of this biomass was 15%. In comparison, for the cultures undertaken in Chu medium, the average dry biomass concentration was 500 mg $L^{-1}$and the lipid content of this biomass was 11%. The recycling of the medium reduced medium costs by 34% and therefore represents a promising strategy for reducing the costs of producing microalgal biomass.

Keywords: Biodiesel; Microalgae; Culture médium reutilization.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	MICROSCOPIA ÓPTICA DA ESPÉCIE DE MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA NESTE TRABALHO.	22
FIGURA 2 -	MICROALGA *Scenedesmus* sp	22
FIGURA 3 -	CULTIVO DE MICROALGAS EM SISTEMA ABERTO (LAGOAS)	24
FIGURA 4 -	CULTIVO DE MICROALGAS EM SISTEMA FECHADO (FOTOBIORREATORES)	24
FIGURA 5 -	REAÇÕES DE FOTOSSÍNTESE	26
FIGURA 6 -	FOTOBIORREATOR NPDEAS	38
FIGURA 7 -	PREPARO DO INÓCULO	42
FIGURA 8 -	PREPARO DO CULTIVO PADRÃO	43
FIGURA 9 -	PREPARO DO CULTIVO COM MEIO CLARIFICADO	44
FIGURA 10 -	FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	45
FIGURA 11 -	CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp., NO MEIO DE CULTIVO PADRÃO E MEIO RECICLADO: A - EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL A JULHO DE 2012 E B - EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.	55
FIGURA 12 -	CONSUMO DE NITRATO NO INÍCIO E NO TÉRMINO DO CULTIVO: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012	57
FIGURA 13 -	CONSUMO DE FOSFATO NO INÍCIO E NO TÉRMINO DO CULTIVO: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012	58
FIGURA 14 -	CONSUMO DE FERRO TOTAL NO INÍCIO E NO TÉRMINO DO CULTIVO: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012	59
FIGURA 15 -	CONSUMO DE POTÁSSIO NO INÍCIO E NO TÉRMINO DO CULTIVO: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.	60
FIGURA 16 -	PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. EM 168 E 240 HORAS: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.	63
FIGURA 17 -	CONTEÚDO LIPÍDICO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. EM 168 E 240 HORAS: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012	64

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO DE MICROALGAS ENTRE LAGOA E FOTOBIORREATOR	25
QUADRO 2 -	COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CHU	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	TEOR LIPÍDICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DA MICROALGA *Scenedesmus*	23
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO ASM	33
TABELA 3 -	COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO BG11	33
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO *GUILLARD F/2* MODIFICADO	34
TABELA 5 -	COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO H/2	34
TABELA 6 -	CULTIVO PRÉVIO (PADRÃO) PARA POSTERIORES EXPERIMENTOS DE RECICLO	55
TABELA 7 -	AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE NUTRIENTES NO MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO	61
TABELA 8 -	INCREMENTO DO CONTEÚDO LIPÍDEOS DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. NO MEIO RECICLADO	64
TABELA 9 -	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM [a] MICROALGA CULTIVADA EM MEIO CHU (PADRÃO); [b] MICROALGA CULTIVADA EM MEIO RECICLADO E DE OUTROS VEGETAIS.	65
TABELA 10 -	COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE IODO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO E DE OUTROS VEGETAIS	66
TABELA 11 -	COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE SAPONIFICAÇÃO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO E DE OUTROS VEGETAIS	67
TABELA 12 -	PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA E CONTEÚDO LIPÍDICO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO	67
TABELA 13 -	CUSTO DO MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NPDEAS -	Núcleo e pesquisa e desenvolvimento de energia autossustentável
UFPR -	Universidade Federal do Paraná
Sp -	Espécie
Microalga [a] -	Cultivada em meio Chu (padrão)
Microalga [b] -	Cultivada em meio reciclado
CEPPA -	Centro de pesquisa e processamento de Alimentos

LISTA DE SÍMBOLOS

C12: 0 -	Ácido Láurico
C14: 0 -	Ácido Merístico
C15: 1 -	Ácido Pentadecenoíco
C16: 0 -	Ácido Palmítico
C16: 1 -	Ácido Palmitoleíco
C17: 0 -	Ácido Margárico
C17: 1 -	Ginkgolico;
C18: 0 -	Ácido esteárico
C18: 1n - 9c-	Ácido oleico
C18: 2n6c -	Ácido Linoleico
C18: 3n3 -	Ácido linolênico
C20: 0 -	Araquidico
C20: 1 -	Eicoseinoíco
C20: 2 -	Eicosadienóico
C22: 0 -	Ácido Beênico
C24: 0 -	Ácido lignocérico
C24: 1 -	Ácido Nervonico
AGS -	Ácidos graxos saturados
AGMI -	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI -	Ácidos graxos poli-insaturados
II -	Índice de Iodo
IS -	Índice de Saponificação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 BIODIESEL 18
2.2 MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL 19
2.2.1 Plantas Oleaginosas 19
2.2.2 Microalgas 20
2.2.3 Microalga *Scenedesmus* sp 21
2.3 CULTIVO DE MICROALGAS 23
2.3.1 Sistema aberto 24
2.3.2 Sistema fechado 24
2.3.3 Fotossíntese 26
2.4 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS DAS MICROALGAS 27
2.4.1 Temperatura 27
2.4.2 Iluminação 28
2.4.3 Aeração 29
2.4.4 pH 30
2.4.5 Nutrientes 30
2.5 Meios de cultivo 32
2.5.1 Meio de Cultivo ASM 33
2.5.2 Meio de Cultivo BG11 33
2.5.3 Meio de Cultivo F/2 34
2.5.4 Meio H/2 34
2.6 RECICLAGEM DO MEIO DE CULTIVO 35
2.7 Produção de microalgas no NPDEAS 36
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS 38
3.1 OBJETIVO GERAL 38
3.1.1 Objetivos específicos 38
4. MATERIAIS E MÉTODOS 39
4.1 MICROALGAS 39
4.2 MEIO DE CULTIVO 39
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO 40
4.3.1 Inóculo 41
4.3.2 Cultivo padrão em meio *Chu* 41
4.3.3 Cultivo com meio clarificado 42
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 43
4.5 AVALIAÇÕES DO CULTIVO 45
4.5.1 Crescimento celular 45
4.5.2 Quantificação dos nutrientes 45
4.5.3 Quantificação da biomassa 46
4.6 Lipídeos Totais 46
4.6.1 Extração de Lipídeos 46
4.6.2 Determinação do perfil dos ácidos graxos 47
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS 49
4.8 TESTE PARA COMPARAÇÃO DE ENTRE OS RECICLOS 50
4.9 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE ENTRE OS EXPERIMENTOS 51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 53

5.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus*sp. NOS CULTIVOS COM MEIO PADRÃO (*CHU*) E NO MEIO RECICLADO..... 53
5.2 CONSUMO DE NUTRIENTES 55
5.2.1 Nitrato..... 56
5.2.2 Fosfato 57
5.2.3 Ferro total..... 58
5.2.4 Potássio 59
5.3 AVALIAÇÕES GERAIS DOS RESULTADOS DO CONSUMO DE NUTRIENTES 60
5.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA SECA 61
5.5 DETERMINAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS 63
5.6 AVALIAÇÃO GERAL DA BIOMASSA SECA E LIPÍDEOS TOTAIS 67
5.7 VIABILIDADE ECONÔMICA DA RECICLAGEM REPETIDA..... 68
6. CONCLUSÃO..... 70
6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 70

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é apresentado como uma alternativa para substituição dos combustíveis fósseis, devido às vantagens técnicas como: menor ponto de fulgor, redução do lançamento do monóxido de carbono e enxofre, não apresentar hidrocarbonetos aromáticos e outras substâncias químicas prejudiciais à saúde e ao ambiente, ser renovável e biodegradável (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2008; HUANG *et al.,* 2010).

Para produzir biodiesel é utilizado atualmente óleo vegetal de plantas oleaginosas (soja, algodão, dendê, entre outras), dentre estas plantas o óleo de soja é o mais utilizado, pois surgiu como subproduto do processamento do farelo de soja que ultimamente tornou-se um dos líderes mundiais no mercado de óleos vegetais. Pelo valor agregado que o agronegócio da soja representa para o mercado energético brasileiro, é fácil identificar que essa oleaginosa detém o maior potencial para servir como padrão no desenvolvimento de um programa nacional de biodiesel, no entanto o preço elevado, a baixa produtividade do óleo são questões importantes a serem analisadas. Avaliando esse cenário, novas pesquisas apresentam a possibilidade da utilização de biomassa de microalgas (MENG *et al.,* 2009).

Microalgas são organismos fotossintetizantes, ou seja, através do processo de fotossíntese, as algas convertem dióxido de carbono (CO_2) e água em glicose e lipídeos em presença de luz. Esses organismos apresentam maior crescimento celular, estima-se que, para produzir uma tonelada de biomassa, a microalga consume 2 toneladas de CO_2, (MALLICK *et al*., 2012). O cultivo de microalgas apresenta produtividade significativamente superior a das plantas oleaginosas e permite uma redução maior da área de cultivo, obtendo assim um aumento da produtividade de biomassa e lipídeos (óleos) (CHISTI, 2007).

Para a biomassa de microalga ser economicamente viável como matéria-prima para a produção do biodiesel em relação às culturas tradicionais é necessário aumentar a produtividade da biomassa e o teor de lipídeos e reduzir os custos dos insumos utilizados no preparo do meio de cultivo. Somente no preparo do meio de cultivo é gasto aproximadamente 35% do valor total do custo da produção de biomassa microalgal (GRIMA *et al.,* 2003). Como os meios de cultivos de microalgas

são líquidos, o volume de água consumido é alto, na ordem de 2 litros por grama de biomassa (RIBEIRO *et al.,* 2012). Uma forma de reduzir os custos da produção da biomassa é a reutilização do meio de cultivo, com isso, haverá a redução do consumo de água e o reaproveitamento dos nutrientes que não foram consumidos no cultivo anterior (RODOLFI *et al*., 2003; KIM *et al*., 2011).

Com este trabalho, espera-se alcançar melhorias no processo produtivo de biomassa de microalga, contribuir para a diminuição de insumos e dar viabilidade econômica ao processo produtivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIODIESEL

O biodiesel é definido como um éster alquílico de ácidos graxos e pode ser obtido de fontes renováveis através de um processo de transesterificação. Transesterificação consiste no processo de obtenção de um éster a partir de outro éster e álcool sendo que a reação é catalisada na presença de ácidos ou bases fortes. Este processo é atualmente utilizado para a obtenção do biodiesel no qual ocorre a conversão de triglicerídeos em ésteres de ácidos graxos (TABATABAEI *et al*., 2011; ANP 7 DE 2008),

O biodiesel é um grande aliado no combate do aquecimento global e a poluição, pois permite o fechamento do ciclo do carbono (CO_2), estabilizando a concentração do gás na atmosfera, o biodiesel substitui o óleo diesel sem que sejam necessários ajustes no motor (CHISTI, 2007; BIOCOMBUSTIVEIS, 2012). Em comparação com diesel oriundo do petróleo, o biodiesel apresenta menor risco de transporte, armazenamento e manipulação, alta eficiência de combustão, emissão reduzida de CO_2, CO, sulfatos, compostos aromáticos e particulados na combustão, é biodegradável, tem elevado ponto de fulgor e lubricidade e a matéria-prima utilizada é de fácil obtenção (AHMAD *et al.,* 2011). O biodiesel pode ser usado puro ou em mistura com o diesel de petróleo (DEMIRBAS, 2008).

Na matriz energética do Brasil, o percentual de 2% de mistura de biodiesel passou a ser obrigatória no País a partir de janeiro de 2008. Esse percentual foi ampliado sucessivamente até atingir 5% em janeiro de 2010, antecipando em três anos a meta estabelecida pala Lei Nº 11.097 de 2005 (BIOCOMBUSTIVEIS, 2012).

A viabilidade econômica da produção de biodiesel está fundamentada no preço do petróleo, pois é um potencial substituto do diesel. O aumento do preço do barril de petróleo que tem ocorrido nos últimos anos, torna mais viável a produção de biodiesel (LOERA–QUEZADA; OLGUÍN, 2010).

As características do biodiesel dependem das estruturas moleculares dos ésteres utilizados e da presença de contaminantes formados durante o processo

produtivo ou na estocagem da matéria-prima. As estruturas moleculares dos ésteres podem variar de acordo com o tamanho da cadeia carbônica, quantidade e posições das insaturações ou devido à presença de agrupamentos na cadeia. Essas diferenças causam um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados. Esses ácidos graxos são propícios à oxidação, portanto o biodiesel apresenta instabilidade quando armazenado por muito tempo (CARDOSO *et al*., 2011). Entretanto, essa instabilidade pode ser resolvida com a utilização de aditivos antioxidantes que proporcionam maior estabilidade ao combustível; eles retardam o início da reação de oxidação, pois reagem com os radicais livres formando compostos estáveis e assim, impossibilitam a propagação das reações em cadeia.

Os aditivos antioxidantes, tais como tocoferóis, esteróis e tocotrienóis, ocorrem naturalmente nos óleos vegetais. No entanto, esses níveis de antioxidantes naturais são fortemente afetados pelo processo de produção do biodiesel e do refino dos óleos, que inclui uma etapa de destilação para a purificação dos ésteres metílicos (biodiesel), podendo deixar pouco ou nenhum antioxidante natural no produto final e assim levar o biodiesel a baixa estabilidade. Deste modo, dependendo do grau de remoção destes compostos e especialmente do grau de instauração dos ésteres, o uso de aditivos antioxidantes sintéticos pode ser considerado como necessidade. Os antioxidantes frequentemente utilizados para diminuir a oxidação do biodiesel são: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG) (DIAS *et al*.,2012).

2.2 MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

2.2.1 Plantas Oleaginosas

A matéria-prima utilizada para produzir biodiesel é o ácido graxo proveniente de plantas oleaginosas tais como soja, milho, canola, palma, girassol e mamona e as gorduras residuais utilizados na fritura de alimentos também podem ser empregadas na síntese do biodiesel.

O clima tropical do Brasil promove o cultivo dessas espécies de oleaginosas, sendo elas nativas ou manejadas, aqui se concentram condições ideais para a

produção de varias espécies que servem de matéria-prima para a produção do biodiesel. Em cada região brasileira existem oleaginosas específicas, que são utilizadas na produção do biodiesel: o dendê e o babaçu existem na região norte, o algodão e a mamona no nordeste, a soja é mais usada no centro-oeste e no sudeste e no sul predomina o uso do girassol.

Para produzir biodiesel de plantas oleaginosas o maior problema é o custo elevado, quando comparado aos combustíveis fósseis como o petróleo. Todavia, esse custo elevado pode ser parcialmente compensado pelo uso de matérias-primas de menor valor agregado, utilizando-se para isso inovações tecnológicas para diminuição dos custos. A escolha da matéria-prima e o custo agregado é um fator importante para o planejamento da produção, pois quando utilizado o óleo vegetal, o custo da matéria-prima varia em torno de 70 - 85% do custo total da produção (MENG *et al.,* 2009; LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010;).

Segundo Ramos *et al*. (2003), as várias fontes disponíveis para a geração de energia renovável, os óleos vegetais se sobressaem não só pelo ajuste das suas propriedades, mas também por representar intenso apoio à agricultura familiar, criando melhores condições de vida para as regiões menos desenvolvida, valorizando assim o potencial da região e proporcionando alternativas a problemas econômicos e socioambientais.

Atualmente várias pesquisas surgem, buscando matérias-primas alternativas para a produção de biodiesel, dentre essas matérias à biomassa de microalgas se destaca.

2.2.2 Microalgas

Microalgas pertencem a um grupo de organismos muito heterogêneos predominantemente aquáticos e na maioria microscópicos unicelulares. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas (RAVEN *et al*., 2001). Esses organismos podem formar colônias com pouca ou nenhuma diferenciação celular e são caracterizados pela presença de pigmentos responsáveis por coloração variada. Atualmente não é possível definir o número exato de espécies de microalgas, relatos indicam existir entre 200.000 há milhões de representantes deste grupo (PULZ; GROSS, 2004).

As microalgas apresentam maior crescimento celular estima-se que cada tonelada de biomassa algal consuma 2 toneladas de CO_2, por meio de fotossíntese. Isso representa 10 a 20 vezes mais do que o absorvido pelas culturas oleaginosas tradicionais (COSTA; MORAIS, 2011; MALLICK *et al*., 2012).

As microalgas têm grande potencial para a produção do biodiesel, pois apresentam uniformidade do organismo, ao contrário das plantas que apresentam folhas, caule, frutos e raízes que deverão ser separados antes da extração dos ácidos graxos (HUNDT; REDDY, 2011; CHISTI, 2007; Makareviciene *et al*., 2011). O biodiesel obtido a partir da biomassa de microalgas possui características físicas e químicas semelhantes às do biodiesel obtido a partir das biomassas tradicionais (soja, pinhão-manso, babaçu, óleo residual, etc.), por possuir lipídeos com características semelhantes (Miao; Wu, 2006; Xu *et al.,* 2006; Chisti, 2007; Cardoso *et al.,* 2011).

No entanto, ainda é necessário superar vários desafios no processo de produção do biodiesel de microalgas (LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010), como:

- Selecionar as melhores cepas de microalgas em termos de teor máximo de óleo (lipídio) e máxima produtividade de biomassa, melhor perfil de lipídeos e adaptação ao tipo de meio de cultivo utilizado e às condições ambientais;
- Desenvolver métodos de cultivo adequados que permitam alcançar máxima produtividade de lipídeos e de biomassa;
- Reaproveitar as águas residuais;
- Desenvolver reatores adequados ou uma combinação deles, para máxima produção de biomassa com menor custo;
- Reduzir o custo da obtenção da biomassa;
- Desenvolver o processo de extração de lipídeos e sua conversão em biodiesel a um custo mínimo.

2.2.3 Microalga *Scenedesmus* sp.

A *Scenedesmus* sp. é uma microalga verde planctônica de água doce. Na natureza é encontrada na forma de agregados com até 5 ou 6 células. Em cultivo de

laboratório ela se apresenta normalmente unicelular, conforme a FIGURA 1 (KNIE; LOPES, 2004).

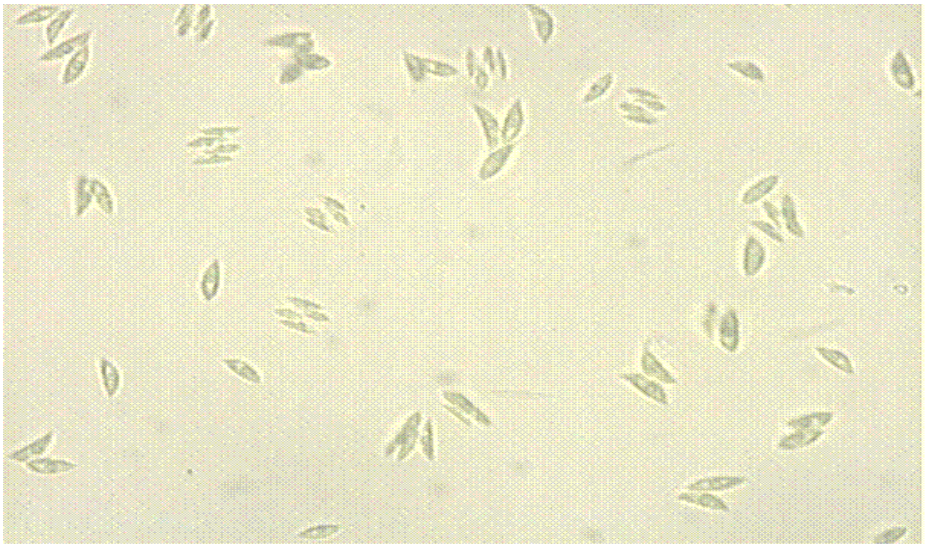


FIGURA 1 - MICROSCOPIA ÓPTICA DA ESPÉCIE DE MICROALGA *Scenedesmus sp.* CULTIVADA NESTE TRABALHO.
FONTE: AUTOR (2013)

As microalgas *Scenedesmus* sp. são clorofiladas unicelulares e uninucleadas, pertencem à família *Scenedesmaceae*. Possuem forma elipsoidal e as colônias são planas formadas por 5 - 6 células cujos eixos mais longos são paralelos entre si como representado na FIGURA 2.

A colonização das *Scenedesmus* é por auto esporulação, cada célula produz um cenóbio (colônia de organismos cujo número de células é geneticamente fixo) completo, o cenóbio-filho pode permanecer unido pelos fragmentos geleificados à membrana materna (LOURENÇO, 2006; GODINHO *et al.,* 2010).

FIGURA 2 - MICROALGA *Scenedesmus sp.*
FONTE: ALGAE (2013)

A TABELA 1 apresenta valores do teor lipídico encontrado para algumas espécies da microalga *Scenedesmus*., esses valores servem de referencia, porem não podem ser utilizados com base para outras espécies do mesmo gênero, visto que ocorre variação do teor de lipídeos entre as espécies.

TABELA 1 - TEOR LIPÍDICO DE DIFERENTES ESPÉCIES DA MICROALGA *Scenedesmus*

Microalga	**Teor Lipídico (%)**	**Fonte**
Scenedesmus oblíquos	13,0 9,4 14,1	Mandal;Mallick, 2009 Mandal;Mallick, 2009 Francisco *et al.,* 2011
Scenedemus quadricauda	18,4	Rodolfi *et al*., 2009
Scenedemus sp. F&M-M19	19,6	Rodolfi *et al*., 2009
Scenedemus sp. DM	21,1	Rodolfi *et al.,* 2009

2.3 CULTIVO DE MICROALGAS

O cultivo de microalgas pode ser realizado em dois sistemas: sistema aberto (lagoas) e sistema fechado (fotobiorreatores), conforme explicado nas próximas seções.

2.3.1 Sistema aberto

O sistema aberto (FIGURA 3) é constituído por canais de recirculação independentes, conhecido como pista de corrida (*raceways*), com profundidade entre 20 e 30 cm. A recirculação e a agitação são promovidas pela ação de pás fixas no inicio de cada lagoa.

Esse sistema tem sido utilizado devido ao baixo custo de implantação. Entretanto, esse tipo de cultivo apresenta desvantagem como produtividade inferior. A baixa produtividade está relacionada a exposição às flutuações diárias e sazonais de temperatura, a passível contaminação por micro-organismos e outras algas que contribuem para a redução da produtividade de biomassa (CHISTI, 2007).

FIGURA 3 - CULTIVO DE MICROALGAS EM SISTEMA ABERTO (LAGOAS)
FONTE: ALGAE (2012)

2.3.2 Sistema fechado

O sistema fechado para o cultivo de microalga e denominado de fotobiorreator (FIGURA 4), sendo ele constituído por tubos de plástico, vidro ou policarbonato, o formato dos tubos pode ser disposto de várias formas, depende da adequação do sistema. Nos fotobiorreatores é possível controlar as condições de cultivo, tal como quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação e pH (Derner *et al*., 2006), o que permite uma alta produtividade de biomassa quando comparados com os sistemas abertos (CHISTI, 2007).

FIGURA 4 - CULTIVO DE MICROALGAS EM SISTEMA FECHADO (FOTOBIORREATORES)
FONTE: NATUREZA ECOLOGICA (2013)

O QUADRO 1 apresenta uma comparação entre lagoa e Fotobiorreator.

QUADRO 1 - COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO DE MICROALGAS ENTRE LAGOA E FOTOBIORREATOR

Parâmetros	**Lagoa**	**Fotobiorreator**
Riscos de contaminação	Alto	Baixo
Perdas de CO_2	Alto	Baixo
Perdas evaporativas	Alto	Baixo
Eficiência do uso da luz	Privado	Excelente
Razão área/Volume	Baixo	Alto
Área requerida	Alto	Baixo
Controle do processo	Difícil	Fácil
Produtividade de biomassa	Baixo	Alto
Custo de implantação	Baixo	Alto
Custo de operação	Baixo	Alto
Custo de manutenção	Alto	Relativamente Baixo
Escalonamento	Fácil	Difícil

FONTE: MATA; MARTINS; CAETANO (2009)

2.3.3 Fotossíntese

A fotossíntese (equação 1) é um processo que consiste na conversão de compostos inorgânicos e energia luminosa em matéria orgânica que ocorre por meio de um conjunto de reações (FIGURA 5), nas algas a fotossíntese ocorre em organelas especializadas chamadas de cloroplastos, que possuem camadas alternadas de membranas lipoproteicas, mais conhecidas como tilacóides e uma fase aquosa, o estroma.

A fotossíntese descreve uma reação de oxirredução, cuja força motriz é a energia luminosa captada por moléculas de clorofila ou outros pigmentos fotossintetizantes, nesta reação, a H_2O doa elétrons para a redução do CO_2 até carboidratos tendo como coproduto o O_2. A reação de fotossíntese pode ser dividida em dois estágios as chamadas reações de claro (fotoquímica) e escuro (química). Nas reações de claro, que ocorrem nas regiões clorofiladas dos cloroplastos, energia luminosa e convertida em energia química, produzindo redutores bioquímicos, $NADPH_2$ e um composto ATP. As reações de escuro ocorrem no estroma, a $NADPH_2$ e o ATP são utilizados nas reações do carboidrato e dióxido de carbono (LOPES, 2004)

$$6CO_2 + 6H_2O \xrightarrow{\text{Luz e Clorofila}} C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad (1)$$

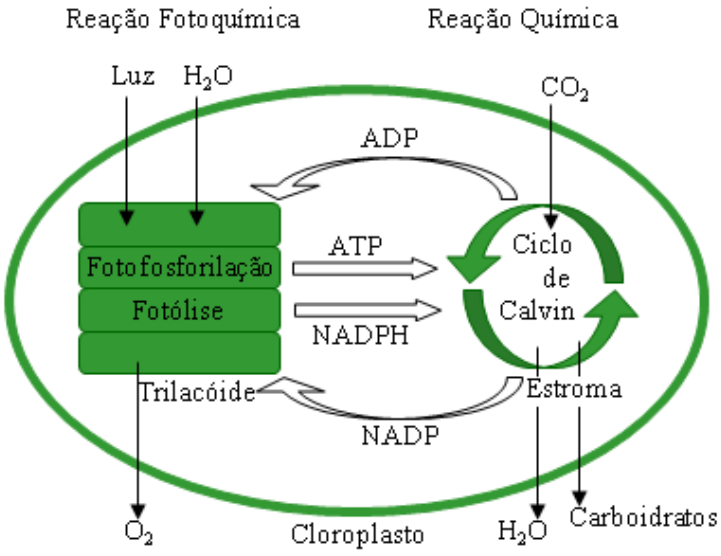


FIGURA 5 – REAÇÕES DE FOTOSSÍNTESE
FONTE: MODIFICADO DE LOPES (2004)

Ciclo de Calvin, é a via metabólica da fixação do CO_2 que conduz a incorporação do carbono em hexoses. O carbono se reduz para níveis de carboidratos e os produtos intermediários que participam da redução do carbono são pentoses fosforiladas. O rendimento da fotossíntese e afeado por fatores internos e externos. Os fatores internos são a estrutura da célula, teor de clorofila, acúmulo de produtos fotossintéticos dentro dos cloroplastos, a influência de enzimas protoplasmáticas e a presença de constituintes minerais. Os fatores externos são a luminosidade nas células, a temperatura, concentrações de dióxido de carbono e oxigênio (MASOJÍDEK *et al*., 2004).

2.4 FATORES QUE AFETAM O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS DAS MICROALGAS

O crescimento das microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos. Os fatores biológicos estão relacionados com as limitações intrínsecas nas velocidades das vias metabólicas, os fatores químicos estão relacionados com a velocidade de crescimento (nutrientes) e os fatores físicos estão relacionados à temperatura, luz e aeração.

2.4.1 Temperatura

A temperatura apresenta grande influencia na produção de biomassa, proteínas, lipídeos e compostos fenólicos das microalgas, é um dos fatores que mais afeta a taxa metabólica dos organismos. A decisão quanto a temperatura decorre do conhecimento das nessidades de cada espécie. Se várias espécies forem cultivadas no mesmo ambiente, a temperatura deverá ser ajustada e tolerável a todas as espécies (por exemplo, 20ºC). Temperaturas constantes mantidas próximas da temperatura ambiente são desejáveis ao cultivo de microalgas, pois estabilizam o cultivo e aumentam a produtividade de biomassa (LOURENÇO, 2006).

Xin *et al* (2011), analisou o efeito da temperatura no cultivo da microalga *Scenedesmus* sp., LX1 em meio BG11, durante 15 dias utilizando temperaturas de

10, 20, 25 e 30ºC. Dentre as temperaturas analisadas, a temperatura que propiciou melhores resultados para a produção de biomassa e lipídeos foi de 20ºC. Após os 15 dias de cultivo a microalga apresentou produtividade de biomassa de 313,3 g e 1,12 g de lipideos. E também observaram um aumento no numero de celulas quando a microalga foi exposta a temperatura (10 e 20ºC), os resultados segerem a possibilidade de deselvolvimento da microalga em temperatuars mais baixas.

O efeito mais pronunciado da temperatura no metabolismo da célula é a influencia na respiração durante a fase escura do cultivo (noite). Nesta fase, a velocidade de respiração das microalgas aumenta exponencialmente com a temperatura. O aumento da velocidade respiratória, principalmente à noite, faz com que diminua a produtividade de biomassa do cultivo, essa perda pode ser minimizada pela redução da temperatura e controle da agitação do cultivo durante a noite (RICHMOND *et al*.,1986; VONSHAK, 1997; CHISTI, 2007).

2.4.2 Iluminação

A intensidade luminosa recebida pelo meio de cultivo é um dos fatores que controlam a velocidade com que o carbono é absorvido pela microalga. Dessa forma, a luminosidade interfere na produção de biomassa e na velocidade de crescimento. Muitos sistemas de cultivo de microalgas são planejados para utilizar a luz natural. A principal vantagem deste método e a diminuição do custo na produção, no entanto, inconvenientes como a variação do fotoperíodo e da intensidade luminosa e variações ambientais, fazem com que os cultivos que utilizam luz natural não sejam estáveis (DERNER *et al*., 2006).

Quanto a intensidade luminosa superior ao ponto de saturação pode levar a fotoinibição. A fotoinibição consiste na diminuição da capacidade fotossintética devido aos danos causados pela intensidade luminosa acima da requerida para a realização da fotossíntese. Outra dificuldade encontrada nos cultivos e a fotolimitação, que ocorre devido ao sombreamento que as células da superfície causam as células que estão mais profundas; estima-se que cerca de 80% das células são expostas a escuridão completa durante alguns instantes. (VONSHAK, 1997; RICHMOND, 2004; CHISTI, 2007).

A condição ótima de iluminação para o crescimento das microalgas dependerá da intensidade da luz, do comprimento de onda e duração aos quais as células estão expostas. Em cultivos de pequena escala, recomenda-se o uso de luz artificial, uma vez que pode ser controlada de acordo com as necessidades das culturas. As lâmpadas mais comumente utilizadas são fluorescentes do tipo luz do dia, por simular comprimentos de ondas de 350 a 700 nm necessários para a fotossíntese. Para manutenção das cepas em tubos de ensaio (15 mL) utiliza-se densidade de fluxo fotônico de 20 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$, enquanto que para cultivos de rotinas (250 mL) de 60 a 70 $\mu E.m^{-2}.s^{-1}$ são suficientes (LOURENÇO 2006). Para cultivos de microalgas são utilizados fotoperíodo de 10:14 ou 12:12 horas de claro/escuro, embora a maioria das espécies cresçam bem com iluminação contínua, quando mantem -se um cultivo com fotoperíodo favorece a sincronização do cultivo, o que é recomendado para estudos fisiológicos, sendo que a divisão celular de muitas espécies ocorre em períodos de escuros (SCHMIDT, 2007).

2.4.3 Aeração

A aeração nos cultivos de microalgas está relacionada a uma serie de fatores que auxiliam no crescimento celular: além de evitar a formação de aglomerados celulares, garante a incidência luminosa uniforme as células, favorecem a captação de CO_2 da atmosfera e a liberação de O_2 do interior do meio de cultivo.

Em cultivos de grande escala, a aeração é feita de diferentes formas, conforme o sistema utilizado.

No sistema aberto (lagoas), é necessária a utilização de pás giratórias ou recirculação da cultura através de bombeamento mecânico. No caso do sistema fechado (fotobiorreator), o processo de aeração é realizado por bombas mecânicas e alguns por ar comprimido. Quando utilizado ar atmosférico comprimido, recomenda-se utilizar filtros antes do ar ser injetado nos cultivos, a fim de diminuir a carga de bactéria e outras partículas evitando a contaminação do cultivo. Existem diferentes tipos de filtros comerciais, assim como os construídos de forma segura, barata e simples utilizando um tubo de PVC, preenchendo de algodão as extremidades e o centro de carvão ativado. (LOURENÇO, 2006; BRENNAN; OWENDE, 2009).

A exposição das células aos ciclos claro/escuro e um fator favorável ao crescimento uma vez que manter as células iluminadas e difícil devido a pequena altura contemplada pela adequada luminosidade. O ciclo claro/escuro no interior da cultura depende da intensidade da luz, da altura do meio liquido, da agitação e da densidade celular. A agitação insuficiente pode obrigar certas células a um regime de baixa incidência luminosa e ate de escuridão, prejudicando seu crescimento. A agitação exerce efeito no fenômeno chamado “sombreamento”, onde apenas parte das células recebe luminosidade suficiente para realização da fotossíntese, enquanto o restante fica na camada menos iluminada devido ao aumento da concentração celular (SCHMIDT, 2007).

2.4.4 pH

Depende da faixa de pH a disponibilidade de vários elementos químicos, estes podem cristalizar ou precipitar dependendo do pH em que encontra-se o cultivo. Assim, o pH deve ser 6,5 a 7,5 faixa neutra para que os nutrientes do meio possam ser absorvidos pelas microalgas. O crescimento da microalga está relacionado ao consumo do CO_2 dissolvido no meio, causando a elevação do pH (> 10). Assim como o aumento da disponibilidade de CO_2 pode reduzir o pH (<5) e inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas (SCHMIDT, 2007; LOURENÇO, 2006).

O uso de tampões permite uma variação discreta no pH, entretanto para sistemas de produção de microalgas de grande escala o uso de tampões aumenta o custo da produção. Uma forma de regular as variações de pH é a aeração dos cultivos com bombeamento de ar atmosférico (0,03% de CO_2) ou com ar enriquecido de CO_2, em concentração ideal para a espécie cultivada (LOURENÇO, 2006).

2.4.5 Nutrientes

A quantidade de lipídeos presentes na célula é afetada pelos nutrientes presentes no meio de cultivo. Existem várias pesquisas com as mais variadas características para o cultivo de microalgas em relação à privação de determinados

nutrientes e seus efeitos no aparato fotossintético, mas a literatura torna-se limitada quanto a pesquisas com nutrientes relacionando produção de biomassa e quantidade de lipídeos, portanto as informações que seguem são para todas as espécies de microalgas (LIMA *et al*., 1999).

O carbono é um dos principais nutrientes necessários para o crescimento da microalga, pois constitui cerca de 50% da biomassa (LOURENÇO, 2006). No meio de cultivo da microalga, o carbono pode estar nas formas de dióxido de carbono (CO_2), ácido carbônico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}).

O nitrogênio é o nutriente que afeta de forma mais crítica a biossíntese armazenamento e composição dos lipídeos. Diversos estudos mostraram que em culturas onde o nitrogênio é um fator limitante, a porcentagem de lipídeos em relação à massa total aumenta consideravelmente (Hu *et al.,* 2008).

Segundo PIORRECK *et al*. (1984), o nitrogênio e conhecido por ter uma forte influencia no metabolismo de varias algas na concentração de lipídeos e ácidos graxos. A insuficiência do nitrogênio leva a um acumulo de lipídeos. Alguns estudos envolvendo algas revelaram que o acumulo de lipídeos e ácidos graxos são influenciados pela quantidade de nitrogênio do meio de cultivo. Observou-se que as algas em baixas concentrações de nitrogênio tem uma tendência a sintetizar lipídeos neutros e ácidos graxos com um baixo grau de instauração. Quando o nitrogênio está em concentrações elevadas sintetizam predominantemente lipídeos polares como os monoglactosil diacilglicerol, diagalactosil diacilglicerol entre outros.

Em seus estudos, PIORRECK *et al*. (1984) constataram que em baixas concentrações de nitrogênio, as algas verdes apresentam grandes contrações de lipídeos totais (44-66% do peso seco). Essas concentrações diminuem expressivamente com o aumento da concentração de nitrogênio.

O fósforo para ser assimilado pelas microalgas deve estar na forma de fosfato. A deficiência de fósforo no meio de cultivo causa um baixo teor lipídico na célula, diminuindo assim a produção de óleo (LOURENÇO, 2006). A concentração de fosfatos orgânicos em águas naturais geralmente excede a de fosfato inorgânico, que e a principal forma das células de microalgas adquirirem fósforo.

Fosfato orgânico e utilizado como fonte primaria de fósforo, o qual e hidrolisado por enzimas extracelulares como fosfoesterases ou fosfatases, resultando em fósforo inorgânico. As concentrações de fosforo para um ótimo

crescimento diferem consideravelmente entre espécies, até mesmo não existindo fator externo limitante (RICHMOND, 1990).

A deficiência do ferro no meio de cultivo de microalgas pode limitar o crescimento e alterar a concentração de clorofila. Em estudo realizado por Pankowski e Mcminn (2009), utilizando concentrações de 10, 11,7 e 20 mol L^{-1} de ferro para a microalga *Cylindrotheca closterium*, observou-se que para a concentração de 10 mol L^{-1} de ferro o crescimento celular foi reduzido em 60%, já para as outras duas concentrações não ocorreu variação significativa. Entretanto,o conteúdo de clorofila nas células apresentou diferenças significativas, proporcionais à variação do ferro no meio. A suplementação do ferro é essencial para o crescimento celular e quantidade de lipídeos neutros, elevando o crescimento em até 56,6% quando comparado ao cultivo sem suplementação de ferro (LIU *et al*., 2008).

O potássio e um cofator para uma grande variedade de enzimas é requerido por todas as espécies de algas. Nas bactérias, potássio esta envolvido na estrutura ribossômica, síntese de proteínas e regulação osmótica, possuindo função similar nas algas (RICHMOND, 1990).

Os micronutrientes metálicos têm como principal função a participação nas estruturas e atividades enzimáticas, bem como na síntese de ácidos graxos, fixação do nitrogênio, respiração e fotossíntese (LOURENÇO, 2006).

2.5 Meios de cultivo

O meio de cultivo utilizado para o cultivo de microalgas deve apresentar características, como ser economicamente viável, atender as necessidades nutricionais dos microrganismos, auxiliar no controle do processo e não causar dificuldades no tratamento final do efluente. A escolha dos meios de cultivos varia de acordo com a espécie e a finalidade do produto, que vão dos mais diluídos aos mais concentrados. A seguir será apresentada nas TABELAS 2, 3, 4 e 5 a composição de alguns meios de cultivo (KNIE; LOPES, 2004).

2.5.1 Meio de Cultivo ASM

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO MEIO DE CULTIVO ASM

Reagentes		Quantidade ($g.L^{-1}$)
Solução A (20 $mL.L^{-1}$)	$NaNO_3$	8,5
	$MgSO_4$	2,45
	$MgCl_2$	2,05
	$CaCl_2$	1,45
Solução B (2 $mL.L^{-1}$)	K_2HPO_4	8,7
	Na_2HPO_4	17,8
Solução C (0,1 $mL.L^{-1}$)	H_3BO_3	24,8
	$MnCl_2$	13,9
	$FeCl_3$	10,8
	$ZnCl_2$	3,35
	$CoCl_2$	0,19
	$CuSO_4$	0,014
Solução D (0,4 $mL.L^{-1}$)	Na_2EDTA	18,6

Fonte: GORHMA,1964

2.5.2 Meio de Cultivo BG11

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO BG11

Reagente	Quantidade ($g.L^{-1}$)
$NaNO_3$	1,50
$CaCl_2.2H_2O$	0,036
$MgSO_4.7H_2O$	0,075
$K_2HPO_4.3H_2O$	0,04
Citrato férrico	0,006
EDTA	0,001
Na_2CO_3	0,02
Ácido cítrico	0,006

FONTE: RIPPKA, 1979

2.5.3 Meio de Cultivo F/2

TABELA 4 - Composição do meio *Guillard F/2* modificado

Solução	Reagentes	Concentração da solução estoque ($g.L^{-1}$)	Concentração no meio de cultivo ($g.L^{-1}$)
Nitrato	$NaNO_3$	75,0000	$7,5.10^{-2}$
Fosfato	$NaH_2PO_4 . 7H_2O$	9,6500	$9,65.10^{-3}$
Metais	$ZnSO_4 . 7H_2O$	0,0220	$2,2.10^{-5}$
	$MnCl_2 . 4H_2O$	0,1800	$1,8.10^{-4}$
	$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	0,0063	$6,3.10^{-6}$
	$CuSO_4 . 5H_2O$	0,0098	$9,8.10^{-6}$
	$Co(NO_3)_2 . 6H_2O$	0,0100	$1,0.10^{-5}$
	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 . 2H_2O$	4,3600	$4,36.10^{-3}$
	$FeCl_3 . 6H_2O$	3,1500	$3,15.10^{-3}$

FONTE: MODIFICADO DE LOURENÇO (2006)

2.5.4 Meio H/2

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO MEIO H/2

Reagentes		Quantidade ($g.L^{-1}$)	Quantidade (mL)
Solução (1) traço metais	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	3,15	-
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	4,36	-
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	9,8	1,0
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,3	1,0
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,0	1,0
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10,0	1,0
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0	1,0
	água destilada	-	1000
Solução (2) vitaminas	Vitamina B_{12}	1,0	1,0
	Biotina	0,1	10,0
	Tiamina	-	200,0 mg
	água destilada	-	1000
Meio H/2	$NaNO_3$	75,0	1,0
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	5,0	1,0
	NH_4Cl	26,8	1,0
	Solução (1)	-	1,0
	Solução (2)	-	0,5
	água destilada (qsp)	-	1000

FONTE: GUILLARD; RYTHER, 1975.

2.6 RECICLAGEM DO MEIO DE CULTIVO

Como o preço do produto é um fator determinante para o processo, pesquisas buscam alternativas de reduzir os custos do produto final sem afetar a qualidade do mesmo, tentando reaproveitar os efluentes gerados. Porém o reuso de certos efluentes não é imediato como pode parecer, para entrar novamente ao processo produtivo o efluente deve apresentar características físicas, químicas e biológicas apropriadas. As limitações dos processos de reuso são devido as concentração de determinadas substâncias e contaminantes específicos, gerados durante o processo de tratamento, que aumentam à medida que a água é reciclada, reduzindo o potencial do reuso e pode comprometer a atividade que adota esta prática.

Uma possível forma de reduzir o custo da produção de microalga é através da reciclagem do meio de cultivo (RODOLFI *et al.,* 2003; KIM *et al*., 2011), que permite a redução de gastos com água e a reutilização dos nutrientes que não foram consumidos no cultivo anterior. Pois para produzir biomassa de microalgas, é gasto aproximadamente 35% do valor total do custo com aquisição do meio de cultivo (GRIMA et al.,2003).

Wu *et al.* (2012) reciclou o meio de cultivo das microalgas *Chlorellavulgaris, Scenedesmus* sp*., Chlorococum* sp*., Nannochloropsis oculata* e *Phaeodactylum tricornutum* utilizou hidróxido de sódio para flocular a biomassa, neutralizou o clarificado com ácido nítrico e suplementou com nutrientes. A produtividade de biomassa foi semelhante a do meio fresco, exceto para os cultivos com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* que após dez dias de cultivo apresentaram redução da biomassa, o resultado encontrado possivelmente é devido a falta ou a disponibilidade de alguns nutrientes.

Pesquisa realizada por Kim *et al*. (2011), reciclando 20% e 50% do meio de cultivo BG11, proveniente do cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. e foi suplementado com meio fresco. Os resultados observados foram semelhantes para concentração de biomassa quando comparado com cultivo utilizando somente meio fresco. Estes resultados sugerem que o meio BG11 está muito concentrado e é possível reciclar o meio sem prejudicar a produtividade de biomassa.

Rodolfi *et al*. (2003), reciclou o meio de cultivo da microalga *Nannochloropsis* sp. e observou uma diminuição de biomassa quando comparados com os cultivos

em meio fresco. Esses resultados indicam que não é possível reutilizar o meio proveniente do cultivo de *Nannochloropsis* sp., devido à liberação de substâncias autoinibidoras pelas células residuais da microalga no meio. Estes resultados sugerem que o meio onde e cultivada a microalga *Nannochloropsis* sp não pode ser reutilizado para cultivos posteriores.

Lemos (2012) cultivou *Scenedesmus* sp. em meio de cultivo *Guillard "F/2"*, a fim de desenvolver um sistema para tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas para produção de biodiesel. Constatou que o crescimento da microalga foi similar ao meio original reutilizando uma vez o meio clarificado. Por se tratar de um meio mais diluído sugere-se que é possível reciclar, pois ainda há a disponibilidades de nutrientes e como observado não houve alteração da produtividade.

Pesquisas sobre reciclagem do meio de cultivo de microalgas são recentes tem sido publicadas por (KIM *et al*., 2011; WU, *et al*., 2012; LEMOS, 2012). Nesta pesquisa foi utilizado um meio de cultivo concentrado (meio *Chu*) e realizado a reciclagem de 50%. Constatou-se ser possível a reciclagem nessa proporção sem prejudicar a produtividade de biomassa e lipídeos, Sugere-se a avaliação desta técnica para que este sistema possa ser adotado nos cultivos de microalgas.

2.7 Produção de microalgas no NPDEAS

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS) localizado na Universidade Federal do Paraná, campus Centro Politécnico, busca uma melhoria no processo produtivo por meio da produção de biodiesel gerado com lipídeos provenientes de microalgas. O processo inicia-se com a produção de microalgas em um fotobiorreator (FBR) compacto Figura 5. Depois de passado o período de cultivo, é necessário realizar colheita da biomassa, recuperar a biomassa, secar, após concluir as etapas e necessário extrair os lipídeos e estes seguem para a produção do biodiesel.

Os fotobiorreatores empregados na produção de biomassa de microalga (FIGURA 6) são construídos com tubos de PVC transparentes, cada unidade possui volume aproximado de 10 m^3, a aeração do cultivo é realizada por compressores de ar industriais, sem adição de CO_2 (RIBEIRO *et al.,* 2009). O meio de cultivo aplicado

é o meio *Chu* e a microalga é *Scenedesmus* sp., para a floculação da biomassa é utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto férrico ($FeCl_3$).

FIGURA 6: FOTOBIORREATOR NPDEAS
FONTE: A AUTORA (2013)

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O elevado custo da produção de microalgas está diretamente relacionado com a aquisição dos nutrientes e o volume de água utilizado para compor o meio de cultivo. Se este for utilizado em escala industrial, pelo sistema de lagoas ou fotobiorreator o volume de água utilizado é muito alto. Assim, desenvolver um sistema de reutilização do meio de cultivo permitirá reduzir o custo da produção de microalgas, uma vez que serão aproveitados o meio aquoso e os nutrientes que não foram consumidos pelas microalgas durante o cultivo anterior. Mesmo que as concentrações dos nutrientes necessitem de ajustes, esta é uma alternativa que pode auxiliar as indústrias de biocombustíveis a assumir uma posição competitiva no mercado energético.

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação de mestrado é avaliar o efeito do reaproveitamento do meio de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp*.,* para a produção de biomassa e lipídeos.

3.1.1 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo geral, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Cultivar a microalga *Scenedesmus* sp;
- Quantificar o consumo de nutrientes pela microalga;
- Avaliar a quantidade de reciclos utilizando o meio clarificado;
- Comparar a qualidade dos lipídeos da microalga cultivada no meio reciclado *versus* o meio tradicional.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICROALGAS

A microalga utilizada neste trabalho foi *Scenedesmus* sp. fornecida pelo NPDEAS - UFPR. A microalga, o meio de cultivo e as condições de cultivo foram mantidos com a finalidade de dar continuidade às pesquisas desenvolvidas pelo NPDEAS (MELLO *et al*., 2010; PENTEADO, 2010; SOARES, 2010; MORAIS, 2011 e LEMOS, 2012).

4.2 MEIO DE CULTIVO

Como meio de cultivo, utilizou-se o meio concentrado (*Chu)*. Inicialmente, preparou-se as soluções estoque. O QUADRO 2 apresenta a concentração das 10 soluções estoque, o volume utilizado para cada litro de meio *Chu* e a concentração (gramas por litro) de cada reagente (KNIE; LOPES, 2004). Para o preparo dessas 10 soluções estoque, pesou-se separadamente cada reagente, transferiu-se os reagentes para balões volumétricos de 1 L e, por fim, aferiu-se com água deionizada. As soluções foram armazenadas em frascos âmbares e mantidas em refrigeradores a 6 ± 2°C, por até seis meses.

QUADRO 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO *CHU*

Solução	Reagente	Concentração da solução estoque ($g\ L^{-1}$)	Volume de solução (L)	Concentração no meio de cultivo ($g\ L^{-1}$)
1	Nitrato de sódio – $NaNO_3$	$2{,}50.10^{1}$	0,01	$2{,}50.10^{-1}$
2	Cloreto de cálcio di-hidratado – $CaCl_3.2H_2O$	$0{,}25.10^{1}$	0,01	$2{,}50.10^{-2}$
3	Sulfato de magnésio heptahidratado – $MgSO_4.\ 7H_2O$	$0{,}75.10^{1}$	0,01	$7{,}50.10^{-2}$
4	Fosfato de potássio dibásico – K_2HPO_4	$0{,}75.10^{1}$	0,01	$7{,}50.10^{-2}$
5	Fosfato de magnésio monobásico –MgH_2PO_4	$1{,}75.10^{1}$	0,01	$1{,}75.10^{-1}$
6	Cloreto de sódio – NaCl	$0{,}25.10^{1}$	0,01	$2{,}50.10^{-2}$
7	EDTA – $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$	$5{,}00.10^{1}$	0,001	$5{,}00.10^{-2}$
	Hidróxido de potássio – KOH	$3{,}10.10^{1}$	0,001	$3{,}10.10^{-2}$
8	Sulfato ferroso heptahidratado – $FeSO_4.\ 7H_2O$	$0{,}49.10^{1}$	0,001	$4{,}98.10^{-3}$
9	Ácido bórico – H_3BO_3	$1{,}14.10^{1}$	0,001	$1{,}14.10^{-2}$
10	Sulfato de zinco heptahidratado – $ZnSO_4.\ 7H_2O$	$8{,}82.10^{-3}$	0,001	$8{,}82.10^{-6}$
	Cloreto de manganês tetrahidratado – $MnCl_2\ .\ 4H_2O$	$1{,}44.10^{-3}$	0,001	$1{,}44.10^{-6}$
	Óxido de molibdênio – MoO_3	$7{,}10.10^{-4}$	0,001	$7{,}10.10^{-7}$
	Sulfato de cobre pentahidratado - $CuSO_4.\ 5H_2O$	$1{,}57.10^{-3}$	0,001	$1{,}57.10^{-6}$
	Nitrato de cobalto hexahidratado - Co $(NO_3)_2$ $6H_2O$	$4{,}90.10^{-4}$	0,001	$4{,}90.10^{-7}$

FONTE: KNIE; LOPES (2004)

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As microalgas foram cultivadas em sala com condições especiais sendo: climatizada com temperatura de 20 ± 2°C, iluminação em foto período (12 horas de luz e 12 horas de escuro), realizada com lâmpadas fluorescentes brancas de 40 Volts e aeração efetuada por compressor conectado a um borbulhado contínuo com vazão de 1 L min^{-1} de ar para cada frasco de *Erlenmeyer* de 2 L, marca vidrolabor.

Os cultivos foram realizados em triplicata. Para isso, utilizaram-se frascos *Erlenmeyer* com capacidade de 2 L, porém padronizados para receber apenas 1,5 L de meio de cultivo.

4.3.1 Inóculo

Para obtenção do inóculo (FIGURA 7), adicionou-se a microalga *Scenedesmus* sp. em meio *Chu* e esta foi mantida em balão de *Erlenmeyer* de 2 L até o quinto dia de cultivo, procedeu-se com a inoculação dos experimentos.

Para determinar a quantidade de inóculo (ml) a ser utilizada no experimento, foi necessário realizar o monitorado do crescimento das microalgas através de leituras em espectrofotômetro UV/VIS. Utilizou-se metodo da diluição para determinar o volume de inóculo (ml) utilizado para dar inicio a todos os cultivos, onde foi padronizada uma absorbância inicial de ± 0,2:

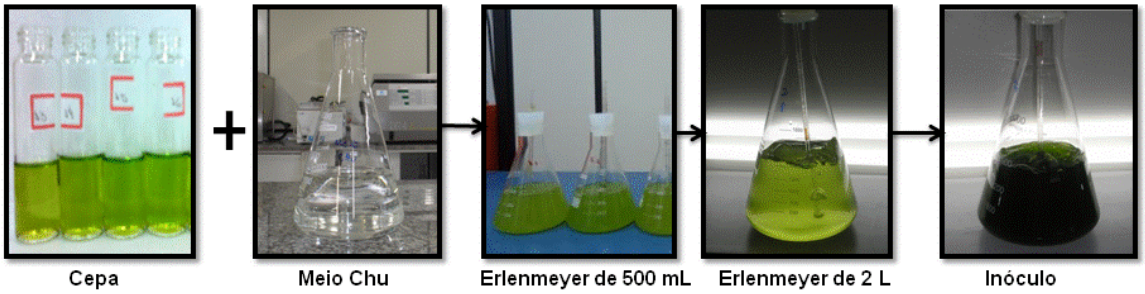


FIGURA 7 - PREPARO DO INÓCULO
FONTE: AUTOR (2013)

4.3.2 Cultivo padrão em meio *Chu*

Após a obtenção do inóculo, transferiu-se uma alíquota do inóculo para um frasco de *Erlenmeyer* com capacidade de 2 L, contendo o meio *Chu*. O crescimento das microalgas foi monitorado através de leituras em espectrofotômetro a 540 nm.

O tempo adotado para o acompanhamento do crescimento das microalgas foi padronizado em 10 (dez) dias, depois de decorrido 10 dias de cultivo as microalgas no meio reciclado entram na fase de declínio (morte). Na seqüência, os frascos contendo o meio de cultivo foram acondicionados em um refrigerador durante 2 (dois) dias, tempo para sedimentar a biomassa.

Depois de decorrido o tempo de refrigeração houve sedimentação da biomassa. Na sequência foi removido o clarificado da parte superior com o cuidado para não carregar a biomassa. O clarificado foi destinado para cultivos posteriores e

a biomassa foi congelada. Após o congelamento da biomassa foi feita a liofilização para posterior extração de lipídeos. A sequência para o preparo do cultivo padrão em meio *Chu* está ilustrada na FIGURA 8.

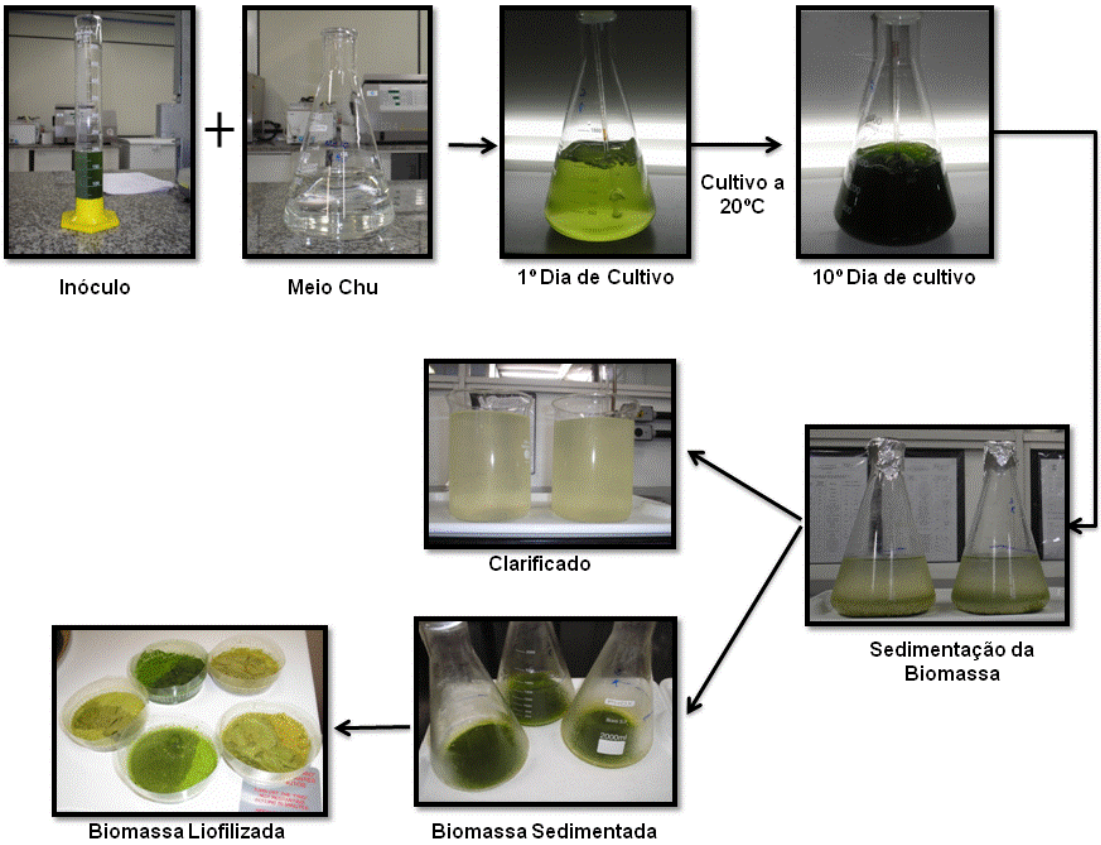


FIGURA 8 - PREPARO DO CULTIVO PADRÃO
FONTE: AUTOR (2013)

A quantificação dos nutrientes foi realizada no inicio do cultivo da microalga (meio *Chu*) e também ao final (meio clarificado sem a biomassa).

4.3.3 Cultivo com meio clarificado

O cultivo com o meio clarificado foi realizado de acordo com o mesmo procedimento do cultivo padrão em meio *Chu* (Seção 4.3.2). Porém, no início, incorporou-se uma etapa a mais que consiste na adição de 50% do clarificado, essa porcentagem do clarificado vai ser utilizada para realizar a pesquisa de reciclo. Para determinar o volume do inóculo a ser utilizado no cultivo seguiu-se (método da

diluição). Foi padronizada uma absorbância inicial de ± 0,2 para iniciar os cultivos e foi completado com o meio *Chu* para um volume final de 1,5 L. A sequência do preparo do cultivo com meio clarificado está ilustrada na FIGURA 9.

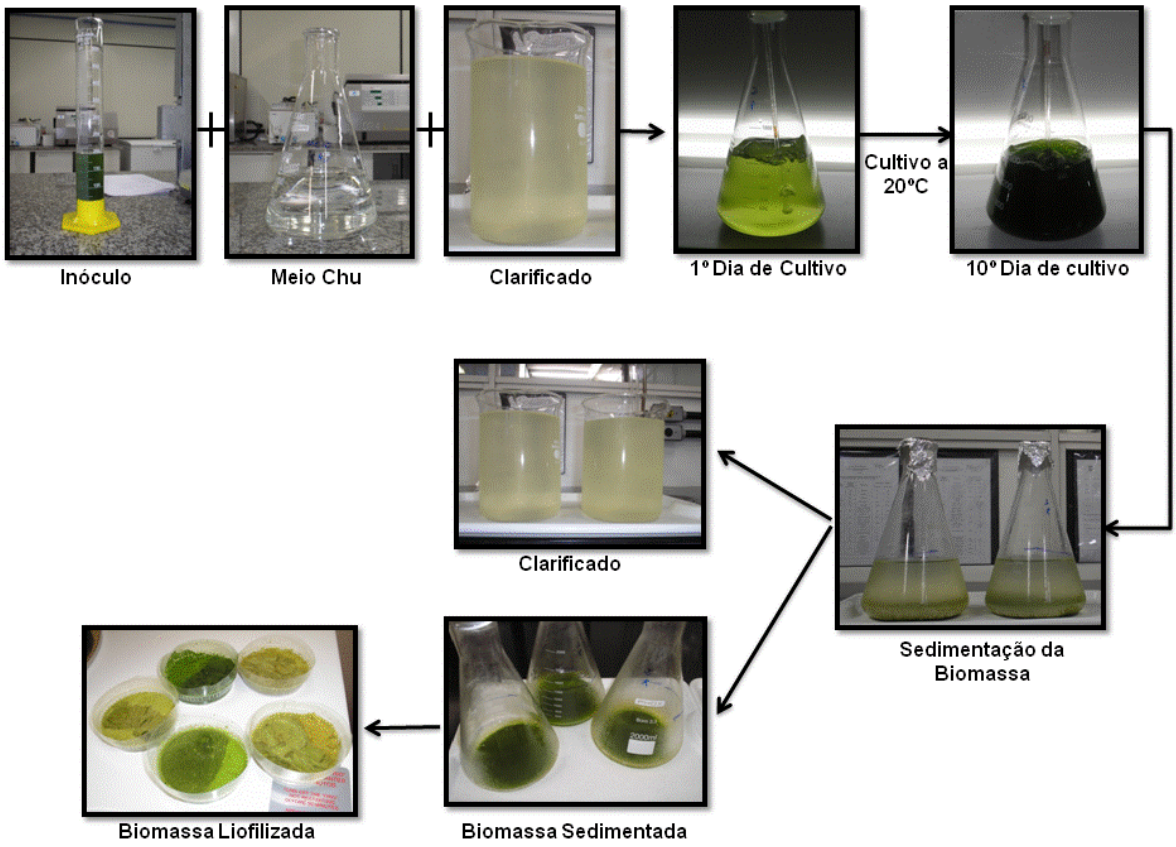


FIGURA 9 - PREPARO DO CULTIVO COM MEIO CLARIFICADO
FONTE: AUTOR (2013)

A quantificação dos nutrientes foi realizada antes do cultivo da microalga (meio clarificado + *Chu*) e também ao final (meio clarificado).

4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para dar inicio à parte experimental com a finalidade de determinar o efeito de reciclagem repetida na cinética de crescimento, fez-se necessário realização de um cultivo prévio para dar origem ao primeiro reciclo como ilustrado na FIGURA 10. Para os demais reciclos foi reutilizado o clarificado do reciclo anterior. Por exemplo,

para iniciar o reciclo 2 foi utilizado 50% do reciclo 1 e seguiu-se o mesmo procedimento para o reciclo 3.

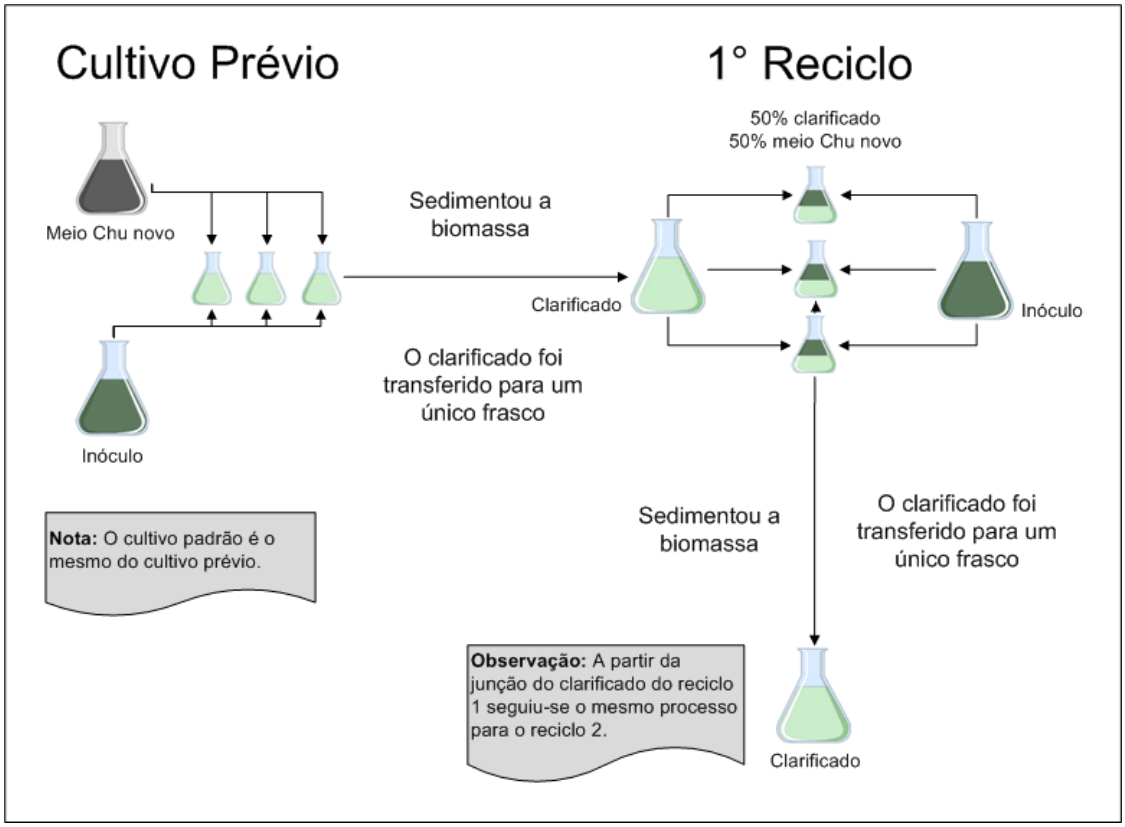


FIGURA 10 - FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL
FONTE: AUTOR (2013)

No término de cada reciclo depois da sedimentação da biomassa os três clarificados (provenientes da triplicata) foram misturados e a seguir o meio “homogeneizado” foi distribuído aos três novos frascos e assim, seguiu-se sucessivamente para os demais cultivos. Cada um desses cultivos foi composto por uma triplicata (repetição) do meio padrão (controle) e outra triplicata do meio clarificado (experimento).

Por sua vez, o meio padrão (controle) foi feito um novo cultivo a cada etapa de reutilização do meio clarificado. O objetivo deste controle foi servir como item de comparação ao experimento realizado (cultivo com o meio clarificado).

Este procedimento foi realizado três vezes, com o objetivo de verificar as mudanças ocorridas na composição do meio clarificado em cada etapa de reciclo do meio de cultivo.

Um primeiro experimento foi realizado entre os meses de abril e julho de 2012. Para reproduzir o experimento, fez-se outro experimento, com as mesmas características do anterior. Este experimento ocorreu entre os meses de agosto e outubro de 2012.

4.5 AVALIAÇÕES DO CULTIVO

Para avaliar o cultivo de microalgas foram utilizadas as técnicas de espectrofotometria UV/VIS, para a quantificação dos nutrientes e de gravimétrica para a quantificação da biomassa e extração de lipídeos, conforme os protocolos fornecidos abaixo.

4.5.1 Crescimento celular

Para avaliar o crescimento das microalgas foram realizadas leituras diárias da absorbância com comprimento de onda de 540 nm em um espectrofotômetro, modelo UV 160 1PC *Shimadzu*, utilizando cubetas de vidro. Seguindo a técnica equação de Lamber-Beer.

4.5.2 Quantificação dos nutrientes

Com a finalidade de avaliar o consumo dos nutrientes (nitrato, fosfato, ferro e potássio), a quantificação foi realizada no início (meio *Chu* para o padrão e meio *Chu* + meio clarificado para os reciclos) e no final (clarificado para o cultivo padrão e cultivo reciclado) de cada cultivo de microalgas.

Para quantificar os nutrientes, utilizou-se metodologia oficial *Standard Methods,* método colorimétrico disponível no capítulo de anexos e na seguinte forma:

- Anexo 1 – seção 1: metodologia para análise do nitrato;
- Anexo 1 – seção 2: metodologia para análise de nitrito; e
- Anexo 1 – seção 3: metodologia para análise de fosfato.

O consumo dos nutrientes foi determinado conforme a equação 2

$$Consumo(\%) = \left(\frac{c_i - c_f}{c_i} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

onde:

c_i = concentração de nutriente inicial;

c_f= concentração de nutriente final.

Para as análises dos elementos de ferro e potássio, foram utilizados procedimentos internos do CEPPA (CEPPA, 2012). Esses procedimentos são realizados com o auxílio de um equipamento da marca Varian modelo 720-ES que é conhecido como ICP OES (*inductively coupled plasma optical emission spectrometer).* A técnica é realizada por leitura direta através de uma curva pré estabelecida no software para cada elemento a ser determinado.

4.5.3 Quantificação da biomassa

Para quantificação da biomassa, seguiu-se metodologia oficial *Standard Methods* (Anexo 2).

4.6 Lipídeos Totais

4.6.1 Extração de Lipídeos

A determinação de lipídeos foi realizada em triplicata com base na metodologia *Bligh & Dyer* (1959), que consiste na utilização de uma mistura monofásica de clorofórmio, metanol e água.

Foram separadas 50 mg da amostra, previamente liofilizada com a utilização de um liofilizador Liotop L101, para tubos de ensaio de 70 ml. Em seguida foi adicionado 10 ml de clorofórmio, 20 ml de metanol e 8 ml de água destilada e

tampou-se hermeticamente os tubos de ensaio. Os três componentes (clorofórmio, metanol e água) foram misturados para a formação de uma solução homogênea.

Na sequência, os tubos foram colocados em um agitador rotatório por 30 min. Em seguida, adicionou-se 10 ml de clorofórmio e 10 ml da solução de sulfato de sódio na concentração de 1,5 %, tampou-se e agitou-se por mais 2 min.

Após a separação das fases, foi retirada uma alíquota de 15 ml da camada inferior (clorofórmio) que foi transferida para dois tubos de 30 ml. Nessa alíquota de 15 ml da camada inferior, foi adicionado aproximadamente 1 g de sulfato de sódio anidro com o objetivo de remover os traços de água. Na sequência, essa alíquota foi filtrada com a utilização de papel filtro qualitativo (marca Qualy).

Depois de filtrada retirou-se e transferiu-se uma alíquota de 5 ml para uma cápsula de vidro previamente tarada. Em seguida, esta cápsula foi colocada em uma estufa com temperatura de 100°C até a evaporação do solvente.

Após a evaporação do solvente, a cápsula foi resfriada em um dessecador. Posteriormente a cápsula foi pesada em balança analítica *Schimatzu AY 220*.

Os lipídeos totais na biomassa foram calculados seguindo a Eq 3:

$$LB(\%) = \frac{(F_2 - F_1).100}{P} \qquad (3)$$

onde:

L_B = lipídeos totais (%);
F_1 = peso do frasco vazio (mg);
F_2 = peso do frasco + lipídeos totais (mg);
P = biomassa liofilizada (mg).

4.6.2 Determinação do perfil dos ácidos graxos

Para determinar o perfil dos ácidos graxos, o lipídeo extraído da biomassa foi derivatizado de acordo com a metodologia AOCS Ce 2-66 (1990)

Em um balão de 50 ml contendo os lipídeos foi acrescentado 4 ml de hidróxido de sódio metanólico e pérolas de vidro. Em seguida, o balão foi levado a um sistema de aquecimento (manta) e conectado a um condensador (Marca Pirex).

A manta de aquecimento (Modelo Q321 A12 da marca Quimis) utilizada neste procedimento foi ajustada ao nível 6 e após a fervura, manteve-se o balão por um tempo adicional entre 5 e 10 min.

Após este tempo adicional, o aquecimento foi interrompido e foi adicionado ao balão 5 ml de trifluoreto de boro em concentração de 14%. O aquecimento foi iniciado com um tempo de fervura igual a 2 min.

Decorridos estes 2 min, cessou-se o aquecimento e o balão foi resfriado por alguns minutos. Na sequência adicionou-se 8 ml de *n*-hexano (grau cromatográfico), e o aquecimento foi reiniciado por mais 1 min de fervura. Após decorrido o tempo desligou-se o sistema de aquecimento.

Em seguida, foi adicionado ao balão 8 ml da solução de cloreto de sódio saturado. O balão foi levado ao *shaker* por um tempo de 5 min (rotação de 1000 rpm). Após estes 5 min, desligou-se o *shaker* e o balão foi colocado em repouso até a formação das fases.

Por fim, a fase superior, contida dentro do balão, foi transferida para um *vial* (frasco de vidro) contendo uma pequena porção de sulfato de sódio anidro. Com a fase de extração concluída, retirou-se uma alíquota de 10 µL para injetar no cromatógrafo com intuito de quantificar os ésteres metílicos dos ácidos graxos.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo a gás Varian CP 3900, equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar CPSIL (88 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições cromatográficas foram:

- a temperatura inicial de 140°C subindo a 2°C por min até 230°C, permanecendo nesta temperatura por 20 min;
- o tempo total da corrida foi de 70 min;
- a temperatura do injetor foi de 260°C;
- a temperatura do detector foi 300°C;
- o gás de arraste foi o N_2(nitrogênio) em pressão constante de 40 psi, *split*: 1:100.

A identificação e a quantificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foram realizadas através da utilização do padrão FAME Mix 37 (Aldrich) com o software Work *Station* 5.0.

4.6.2.1 Determinação do índice de Iodo

Com base no perfil graxo dos ésteres obtidos foi possível estimar o Índice de iodo (II) segundo método AOC Cd 1c-85 definido pela equação 4:

$$II = (\%C16{:}\,1 * 0{,}9976) + (\%C18{:}\,1 * 0{,}8986) + (\%C18{:}\,2 * 1{,}810) + (\%C22{:}\,1 * 0{,}7497) \quad (4)$$

onde:

II = Índice de Iodo ($mgI_2/100_g$)

4.6.2.2 Determinação do índice de saponificação

Com base no perfil graxo dos ésteres obtidos foi possível estimar o índice de saponificação (IS) segundo o método da AOCS Official Method Cd 3a-94

A determinação do índice de saponificação (IS) foi calculada de acordo com a equação 5:

$$IS(mg) = \frac{3 \cdot 56{,}1 \cdot 1000}{[(MM \cdot 3) + 92{,}09] - (3 \cdot 18)} \quad (5)$$

onde:

MM = massa molar média dos ésteres obtidos por calculo a partir do perfil dos ácidos graxos.

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS

Os resultados de biomassa seca, nitrato, fosfato, ferro, potássio e lipídeos obtidos neste trabalho são médias dos resultados de cada experimento, seguido do erro padrão (desvio padrão) das amostras.

4.8 TESTE PARA COMPARAÇÃO DE ENTRE OS RECICLOS

Para avaliar se as médias da triplicata de cada cultivo para a quantidade de biomassa seca e lipídeos totais foram influenciadas pelas etapas de reciclo do meio, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Segundo Siegel (2008), o teste de Kruskal-Wallis pode ser considerado como uma alternativa não paramétrica à tradicional ANOVA (Análise de Variância). Este teste é comumente utilizado para testar se duas ou mais amostras provêm de populações iguais.

As hipóteses são formuladas da seguinte forma:

H_0: Não houve diferença entre os reciclos;

H_1: Pelo menos uma etapa de reciclo é diferente de outra etapa.

A estatística do teste é dada pela equação 6:

$$H = \left[\frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^{k} n_j R_j^2 \right] - 3(N+1) \quad (6)$$

onde:

H = Comparação entre reciclos;

N = tamanho da amostra global;

n_J = tamanho da amostra no reciclo j;

R^2_j = média dos postos no reciclo j.

k = número de amostra dos grupos;

Quando a hipótese nula é rejeitada (p-valor < 0,05), torna-se necessário explorar cada um dos reciclos para identificar quais reciclos diferem entre si. Neste caso, é aplicado um teste para identificação de contrastes (Tukey), dado pela equação 7:

$$\left|R_U - R_v\right| \geq Z\alpha_{|k(k-1)|}\sqrt{\frac{N(N-1)}{12\left(\frac{1}{n_u}+\frac{1}{n_v}\right)}} \quad (7)$$

onde:

R_u = média dos postos no reciclo u;

R_v = média dos postos no reciclo v;

Z = valor tabelado (tabela z);

N = tamanho da amostra total;

n_u = tamanho da amostra no reciclo u;

n_v = tamanho da amostra no reciclo v.

k = número de amostra dos grupos;

Esse teste foi realizado com a utilização do software R.

4.9 TESTE DE REPRODUTIBILIDADE ENTRE OS EXPERIMENTOS

De acordo com Siegel (2008), o teste de Wilcoxon pode ser utilizado para comparar se dois grupos independentes foram extraídos de uma mesma população. Este teste é uma alternativa não paramétrica para o teste *t*.

As hipóteses são formuladas da seguinte forma:

H_0: Não houve diferença entre os experimentos (reprodutibilidade);

H_1: Houve diferenças entre os experimentos (não reprodutibilidade).

O cálculo foi feito conforme a equação 1:

$$d_i = Y_i - X_i \quad (9)$$

onde:

d_i = reprodutibilidade;

Y_i = valor do item i na amostra Y;

X_i = valor do item i na amostra X.

O valor calculado é comparado com o valor tabelado na tabela G (SIEGEL, 2008). Esse teste foi realizado com a utilização do software R. A sequência utilizada está representada no apêndice 1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, apresenta-se a caracterização de um cultivo prévio que deu base para este trabalho (veja seção 4.3.2). Na sequência, apresenta-se a caracterização dos seis cultivos (padrão e meio reutilizando 50% do meio clarificado).

Em seguida são apresentados os resultados obtidos, divididos em quatro subseções:

1ª) avaliação da cinética de crescimento, comparando os experimentos 1 e 2, com a finalidade de reproduzir os resultados dos primeiros cultivos;
2ª) variação de consumo dos nutrientes de cada reciclo e dos referidos padrões;
3ª) quantificação da biomassa seca; e
4ª) determinação de lipídeos totais e a caracterização do perfil dos ácidos graxos.

5.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus*sp. NOS CULTIVOS COM MEIO PADRÃO (*CHU*) E NO MEIO RECICLADO.

A microalga *Scenedesmus* sp. foi cultivada em meio *Chu*, durante 10 dias. O crescimento celular foi monitorado diariamente por densidade óptica através de leituras de absorbância a 540 nm. A FIGURA 11 mostra os perfis de crescimento nos cultivos padrões e nos reciclos dos experimentos 1 e 2.

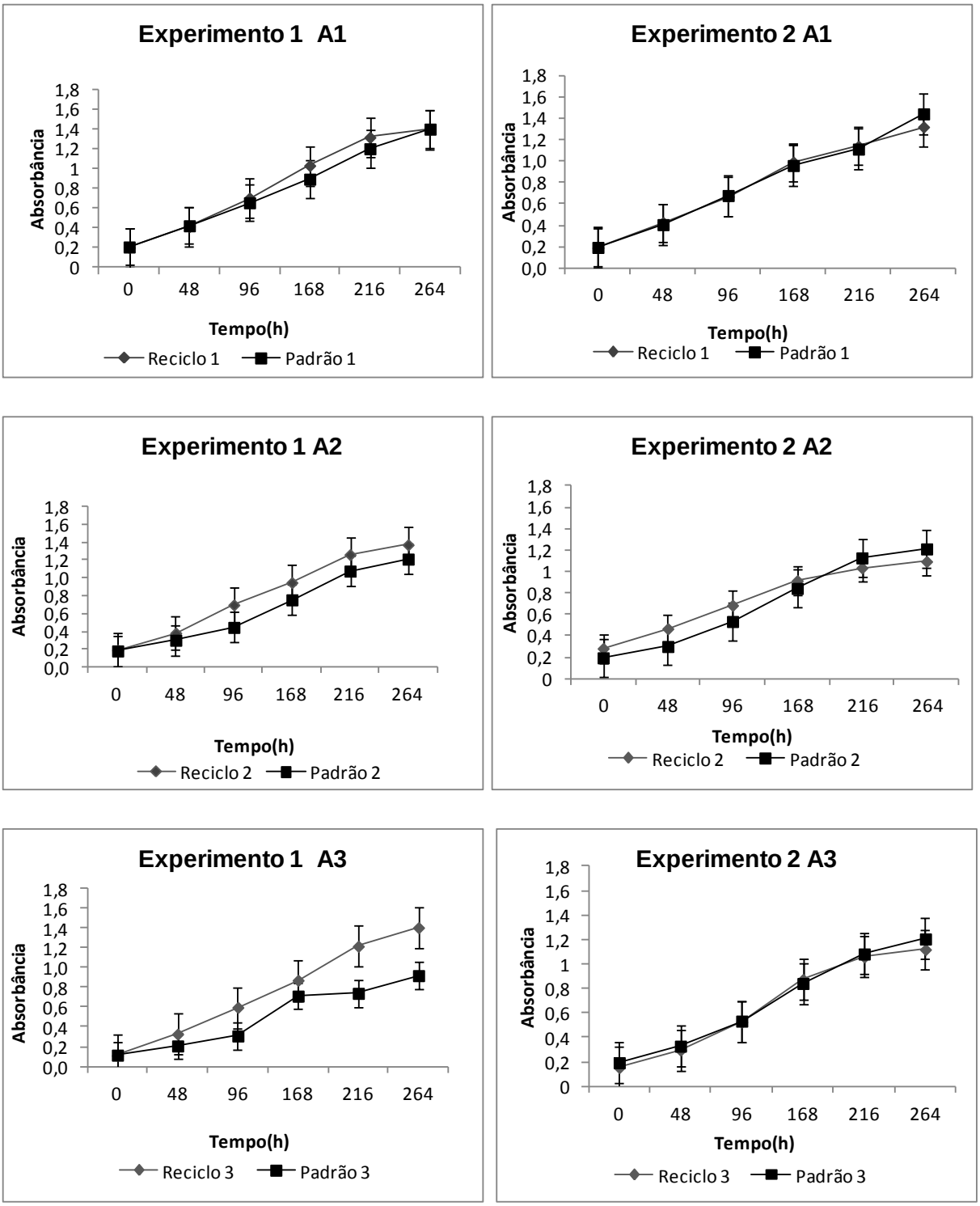


FIGURA 11 - CRESCIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp., NO MEIO DE CULTIVO PADRÃO E MEIO RECICLADO: A - EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL A JULHO DE 2012 E B - EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.

Observa-se que o crescimento da microalga nos seis reciclos praticamente teve o mesmo comportamento, quando comparado com o cultivo padrão, esses

resultados mostram que é possível reutilizar o meio reciclado 50% não alterando no crescimento da microalga.

O experimento 2 teve a finalidade de avaliar a reprodução do crescimento das microalgas no experimento 1. Reprodução consiste na variação de algum item utilizado na repetibilidade, neste trabalho variou-se a época de cultivo. Observa-se que o crescimento da microalga foi praticamente o mesmo no experimento 1 e 2.

5.2 CONSUMO DE NUTRIENTES

A TABELA 6 apresenta os resultados das médias dos nutrientes no inicio e no final do cultivo prévio para os experimentos 1 e 2. Experimento 1 teve inicio em Abril de 2012 e experimento 2 teve inicio em agosto de 2012. O cultivo prévio serviu de suporte para dar inicio os cultivos posteriores com o meio clarificado (reciclos).

TABELA 6 - CULTIVO PRÉVIO (PADRÃO) PARA POSTERIORES EXPERIMENTOS DE RECICLO

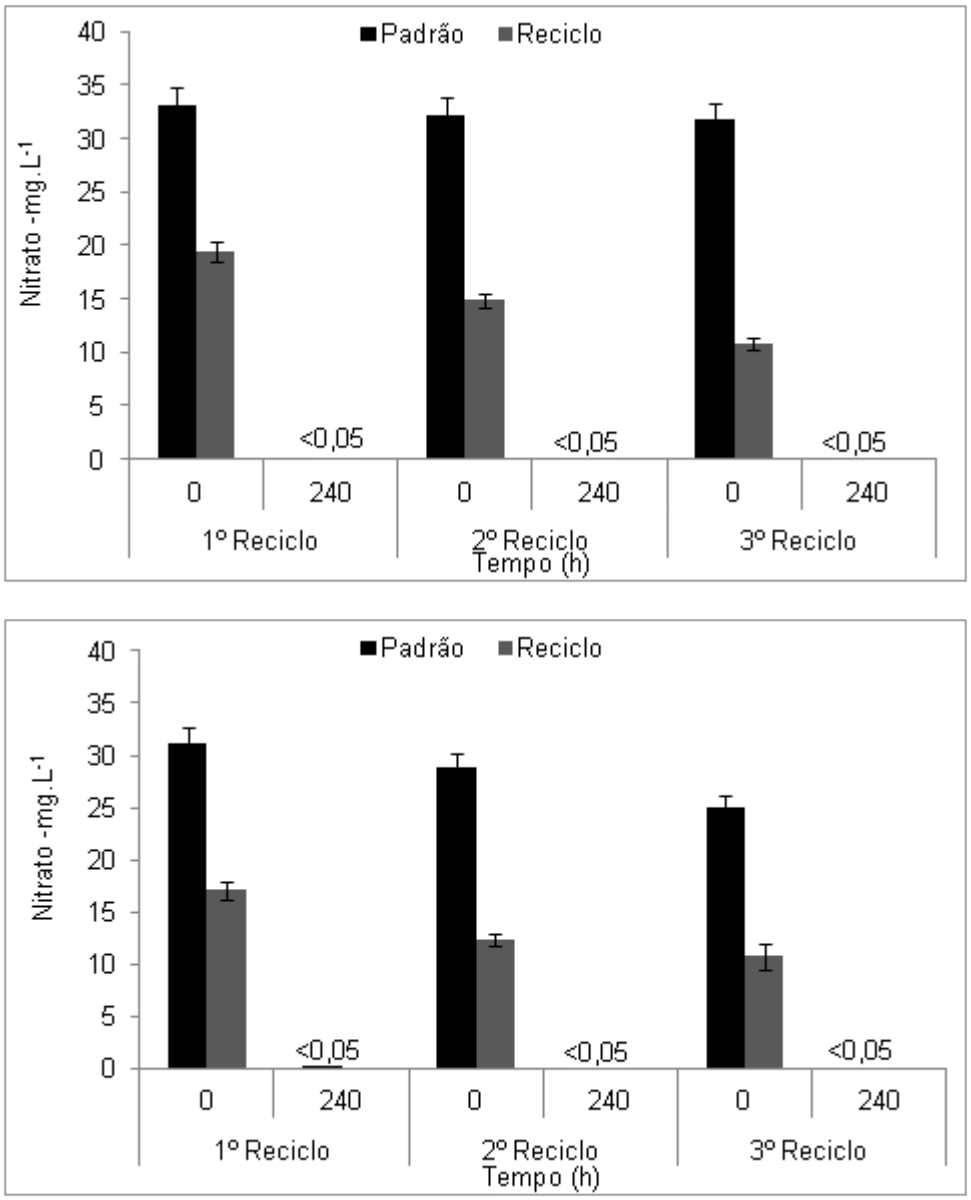
Ensaios	**Padrão (Abril)**		**Padrão (Agosto)**	
	Inicial	**Final**	**Inicial**	**Final**
Nitrato (mgL^{-1})	34,8	0,2	32,1	<0,1
Fosfato (mgL^{-1})	57,1	54,9	48,2	41,1
Ferro total (mgL^{-1})	0,8	0,4	0,7	0,3
Potássio (mgL^{-1})	104,3	101,4	106,3	94,7
pH	6,9	8,1	7,5	8,5
Condutividade a 25 ºC ($\mu s\ cm^{-2}$)	796,0	753,0	857,0	740,0
Lipídeos totais %	-	10,3		11,5
Biomassa seca (mgL^{-1})	7º dia	10º dia	7º dia	10º dia
	240,0	460,0	360,0	480,0

FONTE: AUTOR, (2013)

Na sequência será apresentado o consumo de cada nutriente presente no cultivo.

5.2.1 Nitrato

A FIGURA 12 apresenta os resultados no cultivo padrão1, 2 e 3, seguido dos resultados para os cultivos de reciclos 1, 2 e 3 para o consumo de nitrato utilizando 50% do clarificado realizados no experimento 1.



(A)

(B)

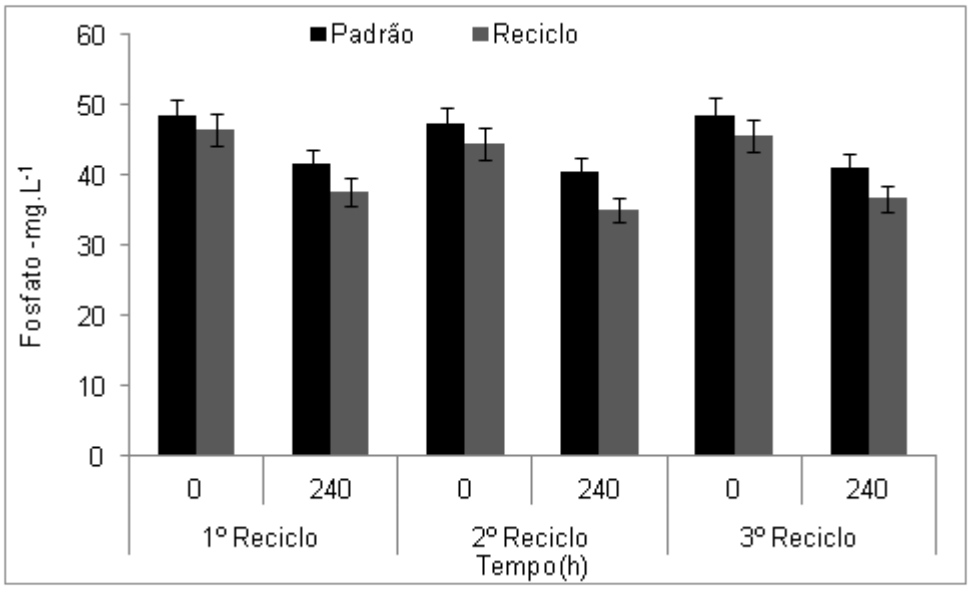
FIGURA 12 - CONSUMO DE NITRATO NO INÍCIO E NO TÉRMINO DO CULTIVO: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.

O nitrato nos cultivos padrões e reciclos foi totalmente consumido pela microalga em 240 horas de cultivo. Nos reciclos, a concentração de nitrato inicial é inferior quando comparada como o meio padrão (*Chu*). A concentração de nitrato

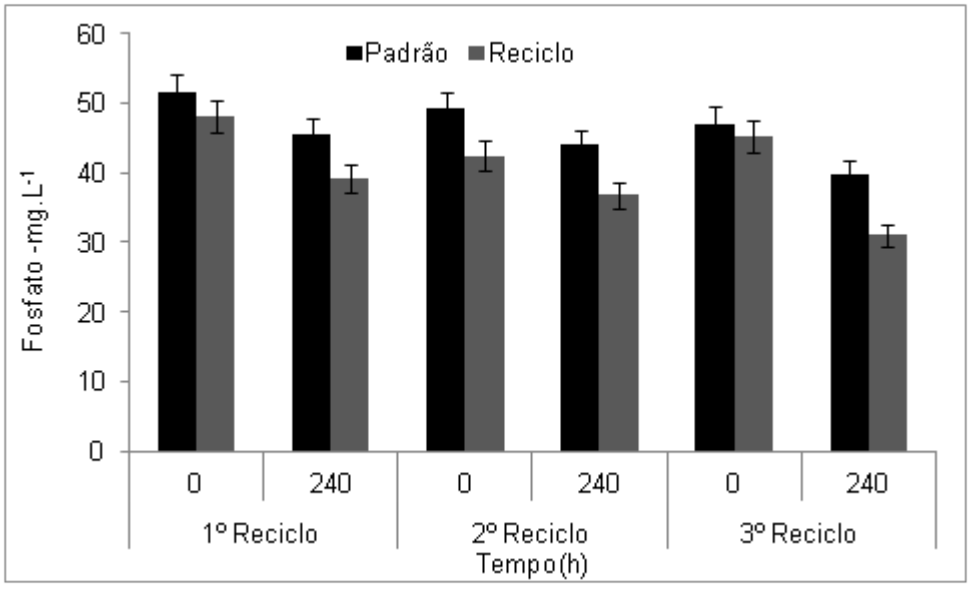
inicial depende da quantidade de meio *Chu* e do inóculo a ser adicionada no meio de cultivo, pois a concentração de inóculo varia de acordo com o crescimento da microalga.

5.2.2 Fosfato

Outro nutriente analisado foi o fosfato, a FIGURA13 apresenta os resultados obtidos.



(A)



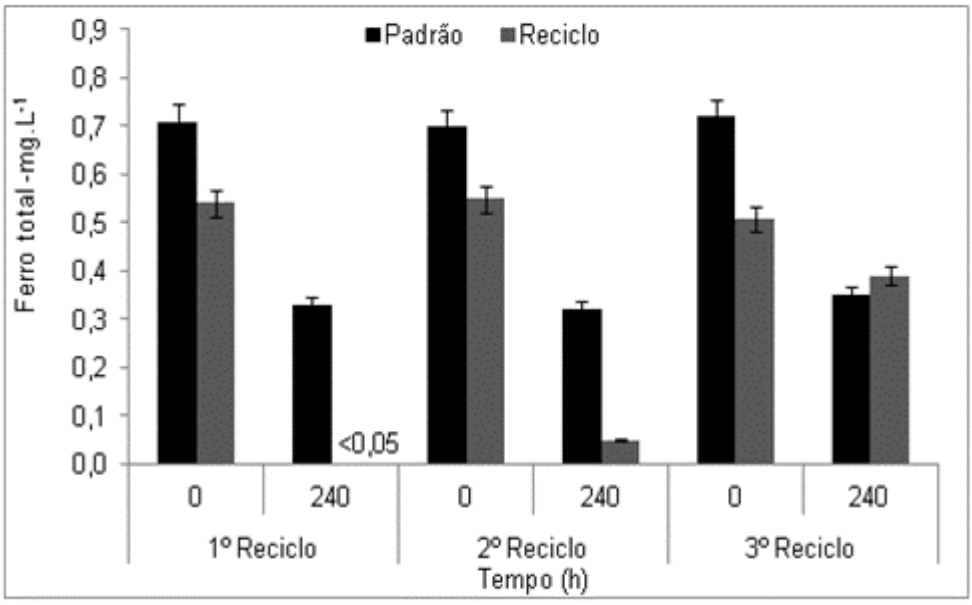
(B)

FIGURA 13 - CONSUMO DE FOSFATO NO INÍCIO E NO TÉRMINO DO CULTIVO: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.

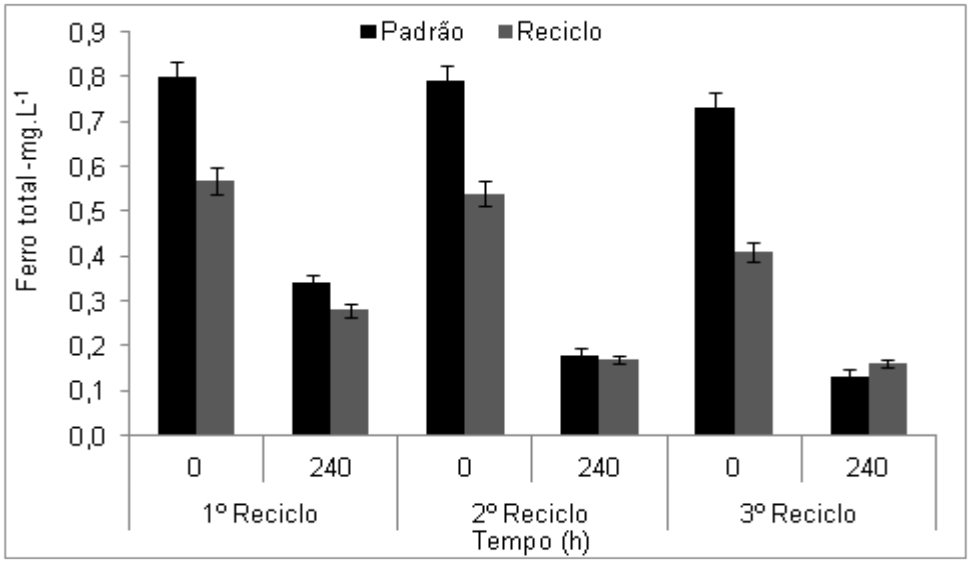
Houve pouco consumo do fosfato durante os 10 dias de cultivo, tanto nos cultivos padrão quanto nos reciclos. Observa-se que, após a realização dos três reciclos, ainda resta uma concentração de 68 - 80% de fosfato no meio de cultivo.

5.2.3 Ferro total

A FIGURA 14 apresenta os resultados obtidos para a determinação de ferro total (Fe^{2+} e Fe^{3+}).



(A)



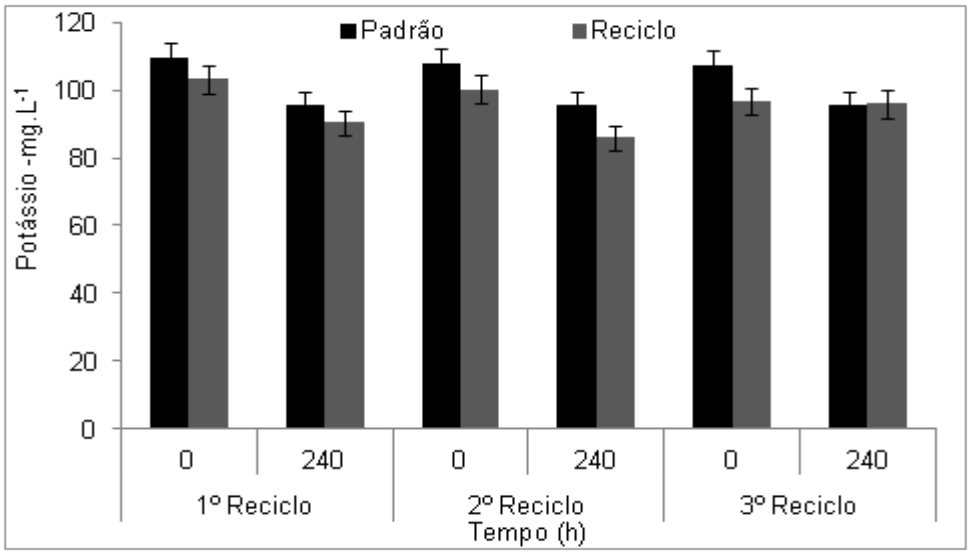
(B)

FIGURA 14 - CONSUMO DE FERRO TOTAL NO INÍCIO E NO TÉRMINO DO CULTIVO: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.

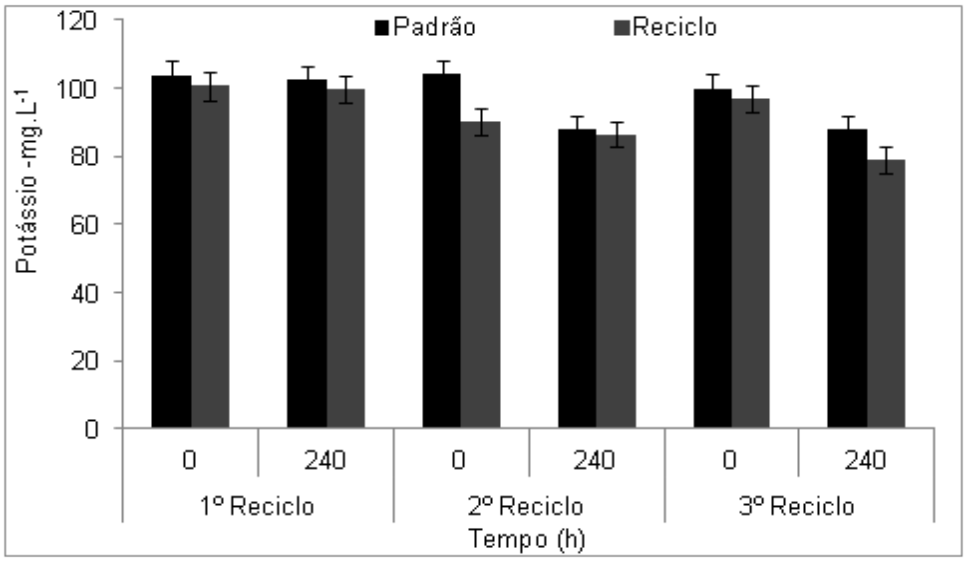
A concentração de ferro total no tempo zero nos reciclos manteve-se inferior, quando comparado com os cultivos padrões. Como observado na FIGURA 14, o consumo de ferro durante o cultivo as 240 horas de cultivo teve variação do consumo entre os reciclos, essa variação foi de 23 - 91 %.

5.2.4 Potássio

A FIGURA 15 apresenta os resultados obtidos para a determinação de potássio.



(A)



(B)

FIGURA 15 - CONSUMO DE POTÁSSIO NO INÍCIO E NO TÉRMINO DO CULTIVO: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.

Os resultados observados para o potássio no meio de cultivo padrão e nos reciclos indicam que houve pouco consumo deste nutriente durante as 240 horas de cultivo.Observamos esse comportamento para o experimento 1 (A) e o experimento 2 (B).

Como observado na figura 13, 14 e 15, os resultados encontrados mostram que, após os cultivos de reciclo, ainda restam concentrações de fosfato, ferro e potássio, como pode ser observado no ultimo cultivo (3º reciclo), somente o nitrato teve consumo total.

Embora os nutrientes, nitrato, fosfato, ferro e potássio estarem em concentrações menores nos reciclos, o crescimento ficou essencialmente igual (ou até melhor), como representado na FIGURA 11, nos cultivos de reciclo a quantidade de nutrientes foi sempre inferior, devido à reutilização do clarificado anterior. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a possibilidade de diminuir a concentração inicial desses nutrientes pela metade sem prejudicar o crescimento. Segundo estudo desenvolvido por Grima *et al*. (2003), é gasto aproximadamente 35% do valor total do custo do óleo para produzir o meio de cultivo.

O experimento 2 teve a finalidade de avaliar a reprodução do crescimento das microalgas no experimento 1. Observa-se que o crescimento da microalga foi praticamente o mesmo em ambos os experimentos.

5.3 AVALIAÇÕES GERAIS DOS RESULTADOS DO CONSUMO DE NUTRIENTES

A TABELA 7 apresenta o consumo dos nutrientes para os reciclos e para o meio de cultivo padrão. Observa-se que durante o período de cultivo, a microalga consome mais que 99 % do nitrato, entre 13 a 32 % de fosfato, 23 % a 91% de ferro total e 1 % a 19 % de potássio. Esse consumo foi observado quando a microalga foi cultivada em meio reciclado. Já para o meio de cultivo padrão (*Chu*) o consumo de nitrato foi maior que 99%, entre 10 e 16% de fosfato, 51 a 83% de ferro1 a 16% de potássio.

Com base no consumo dos nutrientes, observa-se que realizando o cultivo em épocas diferentes houve pouca variação no consumo de fosfato, ferro e potássio,

somente o nitrato foi consumido na sua totalidade entre os experimentos 1 e 2, para os nutrientes fornecidos.

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DO CONSUMO DE NUTRIENTES NO MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO

Nutrientes	Cultivos	Experimento 1			Experimento 2		
		Inicial (mgL^{-1})	Final (mgL^{-1})	Consumo (%)	Inicial (mgL^{-1})	Final (mgL^{-1})	Consumo (%)
Nitrato	Padrão 1	33,19	< 0,05	**99,8**	31,14	0,09	**99,7**
	Padrão 2	32,20	< 0,05	**> 99,8**	28,84	< 0,05	**> 99,8**
	Padrão 3	31,80	< 0,05	**> 99,8**	25,00	< 0,05	**> 99,8**
	Reciclo 1	19,48	< 0,05	**> 99,7**	17,10	< 0,05	**> 99,7**
	Reciclo 2	14,84	< 0,05	**> 99,7**	12,38	< 0,05	**> 99,6**
	Reciclo 3	10,80	< 0,05	**> 99,5**	10,70	< 0,05	**> 99,5**
Fosfato	Padrão 1	48,42	41,61	**14,1**	51,67	45,46	**12,0**
	Padrão 2	47,34	40,57	**14,3**	49,13	43,97	**10,5**
	Padrão 3	48,52	40,91	**15,7**	47,06	39,81	**15,4**
	Reciclo 1	46,45	37,60	**19,1**	48,10	39,20	**18,5**
	Reciclo 2	44,48	35,04	**21,2**	42,42	36,86	**13,1**
	Reciclo 3	45,62	36,66	**19,6**	45,22	31,07	**31,3**
Ferro	Padrão 1	0,71	0,33	**53,5**	0,80	0,34	**57,5**
	Padrão 2	0,70	0,32	**54,3**	0,79	0,18	**77,2**
	Padrão 3	0,72	0,35	**51,4**	0,73	0,13	**82,2**
	Reciclo 1	0,54	< 0,05	**> 90,7**	0,57	0,28	**50,9**
	Reciclo 2	0,55	< 0,05	**> 90,9**	0,54	0,17	**68,5**
	Reciclo 3	0,51	0,39	**23,5**	0,41	0,16	**61,0**
Potássio	Padrão 1	109,36	95,43	**12,7**	103,78	102,62	**1,1**
	Padrão 2	108,16	95,52	**11,7**	104,03	87,82	**15,6**
	Padrão 3	107,36	95,42	**11,1**	100,03	87,82	**12,2**
	Reciclo 1	103,30	90,47	**12,4**	114,76	107,81	**6,1**
	Reciclo 2	100,25	85,91	**14,3**	90,32	86,57	**4,2**
	Reciclo 3	96,89	95,96	**1,0**	97,14	78,95	**18,7**

5.4 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA SECA

A FIGURA 16 apresenta os resultados obtidos para a determinação de biomassa seca.

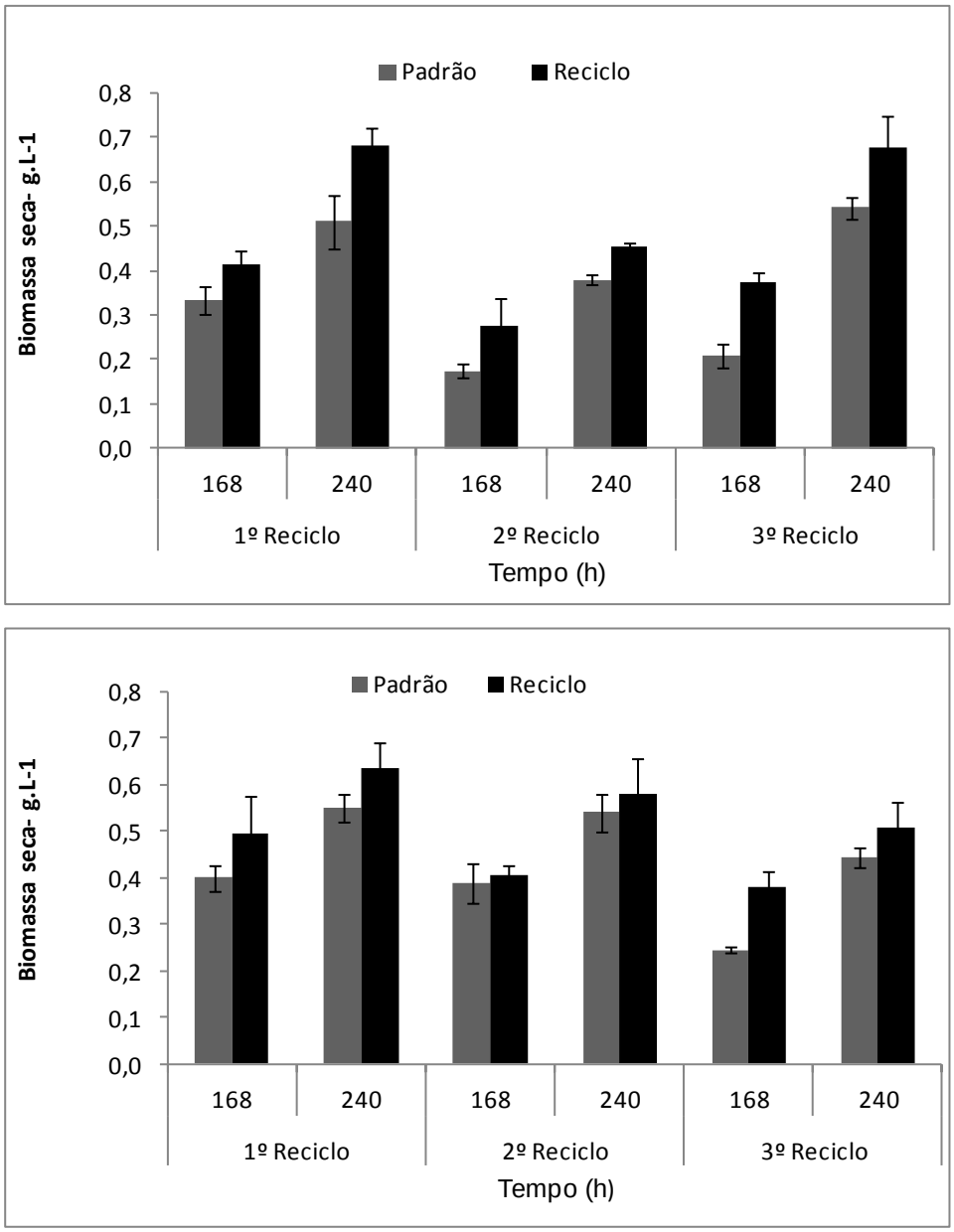


FIGURA 16 - BIOMASSA SECA DA MICROALGA *Scenedesmus*sp. EM 168 E 240 HORAS: A - EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B - EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.

A concentração de biomassa produzida durante o cultivo variou significativamente ao longo dos reciclos sequenciais (p = 0.03). Portanto, houve necessidade de comparar os reciclos. Esta comparação foi realizada com a aplicação do teste de contraste. Este teste mostrou que houve divergência entre as etapas 1 e 2 do reciclo. Por outro lado, não houve divergência quando comparados o reciclo 1 *versus* 3 e o 2 *versus* 3.

A reprodutibilidade dos experimentos 1 e 2 foi comprovada estatisticamente através do teste de Wilcoxon (*p*-valor = 0.59). Além disso, na FIGURA16 é possível avaliar que a biomassa seca dos reciclos manteve-se superior ao cultivo padrão em ambos os experimentos.

5.5 DETERMINAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS

A FIGURA 17 apresenta os resultados obtidos neste trabalho para lipídeos totais extraídos da biomassa seca.

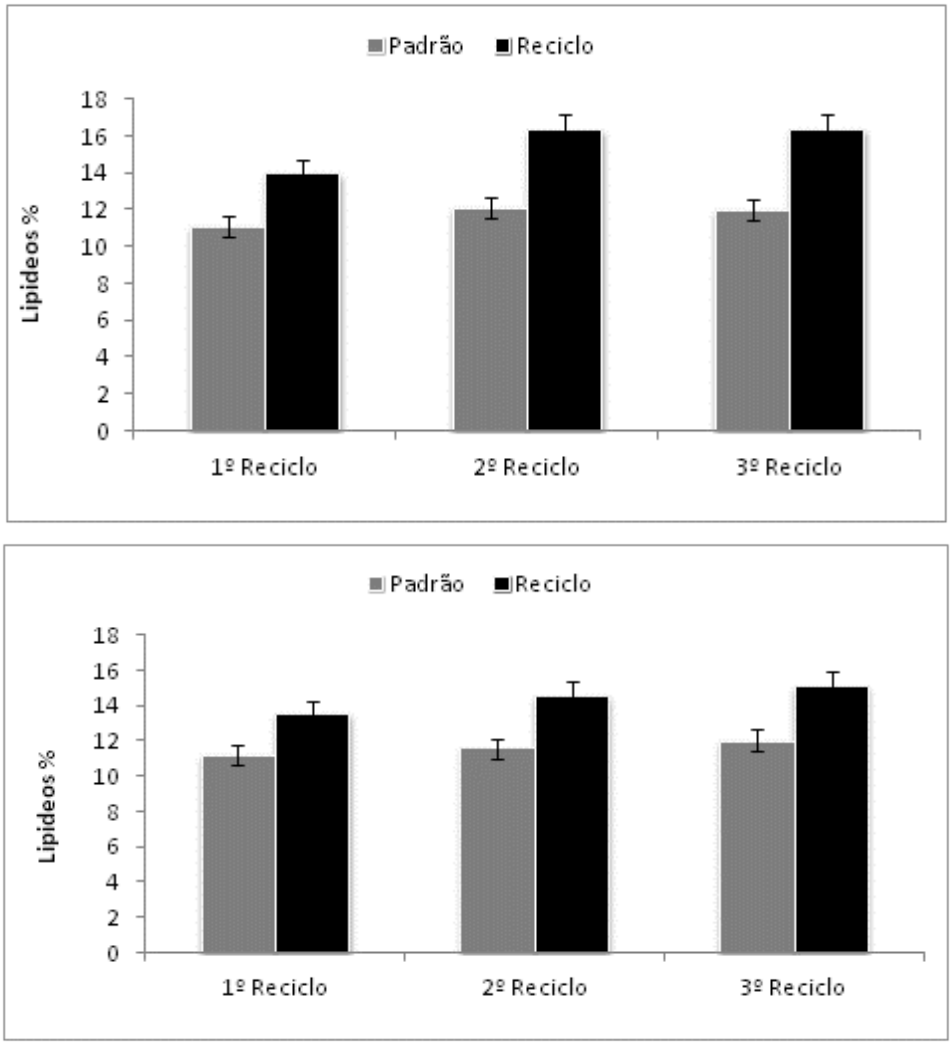


FIGURA 17 - CONTEÚDO LIPÍDICO DA MICROALGA Scenedesmus sp. EM 168 E 240 HORAS: A – EXPERIMENTO 1, ENTRE ABRIL E JULHO DE 2012 E B – EXPERIMENTO 2, ENTRE AGOSTO E OUTUBRO DE 2012.

Após a realização do teste estatístico de Kruskal-Wallis, com P=0.5 %. O teste apresentou um p = 0.06, indicando a não rejeição da hipótese nula (H_0: não houve diferença entre os reciclos *versus* H_1: houve diferença entre os reciclos). Não houve diferença significativa entre os reciclos, portanto, não houve necessidade de comparar contrastes (reprodutibilidade).

Observa-se que a concentração de lipídeos totais manteve-se superior nos reciclos quando comparado com o cultivo padrão, sendo observado o mesmo comportamento para a biomassa seca. Segundo estudo realizado por Hu *et al*. (2008), as algas produzem mais lipídeos em condição de stress ou ambientes desfavoráveis em comparação com condições ótimas de crescimento. No presente trabalho, a condição de estress foi a redução de 50% dos nutrientes; essa condição fez com que a microalga acumule os lipídeos na sua estrutura como fonte de reserva para um periodo de privação nutricional.

A TABELA 8 apresenta a produtividade do óleo (%), quando comparado com o conteudo lipidico padrão, essa produtividade foi reproduzida experimento 2 com o intuito de confirmar os resultados anteriores do experimentos 1.

Esses resultados podem ser explicados bioquimicamente, pois quando a microalga é submetida a uma condição de stress (que nesta pesquisa foi a redução dos nutrientes) altera a via biossintética lipídica podendo levar ao aumento de lipídeos totais, essencialmente à produção e acumulação de triglicéridos. Estes triglicerideos são constituídos por ésteres de ácidos graxos e glicerol e funcionam como armazenamento de carbono e energia. Devido essa rota biossintetica é possível a acumulação dos ácidos graxos que posteriormente podem ser utilizados para produção do biodiesel.

TABELA 8 - INCREMENTO DO CONTEÚDO LIPÍDEOS DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. NO MEIO RECICLADO

Experimento	**Cultivos**	**Conteúdo lipídico (%)**		**Produtividade de óleo (%)**
		Padrão	**Reciclo**	
1	1º	11,0	14,0	30,0
	2º	12,0	16,0	35,0
	3º	12,0	16,0	35,0
2	1º	11,0	14,0	20,0
	2º	12,0	15,0	25,0
	3º	12,0	15,0	27,0

Para avaliar o perfil do óleo de microalga (lipídeo) no meio utilizando o clarificado e no padrão, foi realizado analise cromatografica com a finalidade de obter o perfil dos ácidos graxos e também esse perfil foi comparado com os perfis de outros óleos, óleo de soja, algodão, canola e palma. A TABELA 9 apresenta esses resultados.

TABELA 9 - PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM[a]MICROALGA CULTIVADA EM MEIO CHU (PADRÃO); [b] MICROALGA CULTIVADA EM MEIO RECICLADOE DE OUTROS VEGETAIS.

Ácido graxo	***Microalga[a]***	***Microalga[b]***	***Soja***	***Algodão***	***Canola***	***Palma***
C12:0	0	0	0	0		0,18
C14:0	3,25	0,78	0,06	1,50	0,06	0,71
C15:1	3,49	0,57	0	0		0
C16:0	15,56	19,91	9,90	25,00	3,75	41,86
C16:1	5,39	2,33	0,08	0	0,21	0,14
C17:0	0	0	0,10	0	0,04	0,09
C17:1	0	1,08	0,08	0	0	0
C18:0	1,68	1,52	3,94	1,72	1,87	4,86
C18:1	5,59	37,21	21,35	28,00	62,41	42,09
C18:2	18,49	6,56	56,02	40,00	20,12	8,67
C18:3	5,20	3,22	7,15	0,50	8,37	0,22
C20:0	6,83	6,35	0,41	0	0,64	0,37
C20:1	37,50	20,47	0	0	1,54	0,16
C20:2	0	0	0	0	0,11	0
C22:0	0	0	0	0	0,35	0,06
C24:0	0	0	0	0	0,27	0,08
C24:1	0	0	0	0	0,26	0
AGS	27,32	28,56	14,41	28,22	6,98	48,21
AGMI	51,97	61,66	21,51	28,00	64,42	42,39
AGPI	23,69	9,78	63,17	40,50	28,60	8,89
FONTE	Autor	Autor	Zambiazi *et al*, 2007	Dantas, 2006	Zambiazi *et al*, 2007	Corsini *et a*l., 2008

Observa-se que os resultados encontrados para os AGS das microalgas[a b] são semelhantes aos resultados encontrados para o óleo de algodão. Os resultados encontrados para os AGMI das microalgas [a b] são similares aos resultados obtidos para o óleo de canola. Para AGPI da microalga[a] apresentam valores semelhantes

quando comparado como o óleo de canola, já para a microalga [b] os valores encontrados para os AGPI são similares ao óleo de palma. Os resultados encontrados para a microalga[b] sugerem a possibilidade de utilizar o óleo de microalga para produção do biodiesel devido à semelhança com os óleos vegetais. Segundo Chisti (2007), para o óleo ser de boa qualidade, deve ter pouco ácido graxo poli-insaturado na sua estrutura, pois esses ácidos causam instabilidade oxidativa, necessitando de antioxidantes, a utilização desses antioxidantes eleva o custo do biodiesel.

Com a finalidade de confirmar a qualidade do óleo realizados testes de iodo e saponificação. O índice de iodo no biodiesel refere-se ao grau de insaturação de um triglicerídeo. O número de insaturações não tem apenas efeito nos valores de densidade e viscosidade do biodiesel, mas também é de grande importância na estabilidade oxidativa (LOZANO, 1996).

Os resultados encontrados neste trabalho estão apresentados na TABELA 10. No Brasil, a legislação não estabelece um limite máximo para o índice de iodo e saponificação, somente exige que registre o valor encontrado, pois esses resultados posteriormente auxiliaram na definição do limite para o índice de Iodo e saponificação.

O índice de saponificação no biodiesel tem a finalidade de avaliar a presença de ácidos graxos que não foram transesterificados. Essa determinação é útil para verificação do peso molecular médio e adulteração do óleo (REDA *et al.,* 2007).

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE IODO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO E DE OUTROS VEGETAIS

Lipídeos	Índice de Iodo	Fonte
Microalga [a] (meio *Chu*)	44	Autor
Microalga [b] (meio reciclado)	48	Autor
Algodão	99 - 119	Anvisa, 1999
Soja	120 - 143	Anvisa, 1999
Mamona	81 - 91	Costa, 2006

Os resultados encontrados neste trabalho para os óleos das microalgas [a] [b] para o índice de iodo são inferiores aos valores encontrados para outros óleos. Valores elevados para o índice de iodo podem indicar maior propensão à ocorrência

de processos oxidativos na molécula do ácido graxo insaturado. Para o óleo ser aproveitado no processo de produção, é necessário que o índice de iodo esteja abaixo de 135 mgL^{-1}, pois um valor acima é impróprio para a produção do biodiesel, devido à tendência de formação de depósitos de carbono (Melo, 2010).

Os resultados encontrados para os óleos das microalgas [a] [b] para o índice de saponificação (TABELA 11) são superiores aos valores encontrados para outros óleos vegetais. Segundo Jorge e Luzia (2012), um índice de saponificação elevado indica ácidos graxos de pesos moleculares baixos, ou seja, o processo de transesterificação não foi completo.

TABELA 11- COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE SAPONIFICAÇÃO DA MICROALGA *Scenedesmus*sp. CULTIVADA EM MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO E DE OUTROS VEGETAIS

Lipídeos	Índice de saponificação	Fonte
Microalga [a] (meio *Chu*)	335	Autor
Microalga [b](meio reciclado)	254	Autor
Algodão	189 - 198	Anvisa, 1999
Soja	189 - 195	Anvisa, 1999
Mamona	176 - 187	Costa, 2006

5.6 AVALIAÇÃO GERAL DA BIOMASSA SECA E LIPÍDEOS TOTAIS

A TABELA apresenta os resultados encontrados neste trabalho para biomassa seca e teor de lipídeos.

TABELA 12 - PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA SECA E CONTEÚDO LIPÍDICO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA EM MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO

	Experimento 1		Experimento 2	
Cultivos	Biomassa seca (mg. L^{-1})	Lipídeos (%)	Biomassa seca (mg. L^{-1})	Lipídeos (%)
Padrão 1	510± 0,1	11 ± 0,6	550 ± 0,0	11,21 ± 0,6
Padrão 2	380± 0,0	12 ± 0,6	540± 0,0	11,58 ± 0,6
Padrão 3	542± 0,0	12 ± 0,6	445± 0,0	12,02 ± 0,6
Reciclo 1	680± 0,0	14 ± 0,7	637± 0,0	13,57 ± 0,7
Reciclo 2	453 ± 0,0	16± 0,8	580± 0,1	14,60 ± 0,7
Reciclo 3	677± 0,1	16± 0,8	510± 0,0	15,13 ± 0,8

Nos experimentos 1 e 2, a biomassa seca quantificada nos reciclos foi superior quando comparada com a biomassa do cultivo padrão (*Chu*) e o mesmo comportamento pode ser observado para os lipídeos. Esses resultados sugerem a possibilidade de reduzir os nutrientes em 50%, aumentando assim de 39,8 – 65,5% a produtividade de lipideos e de 12,5 - 26% a produtividade em biomassa. A economia desse cultivo será maior pois existe maior produtividade reciclando o meio de cultivo.

5.7 VIABILIDADE ECONÔMICA DA RECICLAGEM REPETIDA

A viabilidade econômica da produção de biomassa de microalgas com o efeito da reciclagem repetida do meio de cultivo foi calculada com base no custo dos nutrientes do meio *Chu*, da água e do lançamento do efluente.

A TABELA 13 apresenta o custo do meio padrão e meio reciclado para o cultivo de microalgas. O volume do cultivo utilizado mo calculo foi o de um fotobiorreator do NPDEAS, 10 m^3 e foi considerado que será reciclado 50% do meio de cultivo três vezes.

Assim, para comparar o custo do cultivo com meio padrão e meio reciclado, considerou-se o custo da produção de quatro cultivos para o meio padrão (40 m^3) e multiplicou pelo valor tabelado da Sanepar (ANEXO 3) para água e efluentes. Seguiu-se o mesmo procedimento para calcular o custo do meio reciclado, como foi reciclado tres vezes o meio reciclado , admitiu-se o custo de 10 m^3 como cultivo prévio e mais 15 m^3 referente a taxa de reciclo que foi de tres vezes,totalizando 25 m^3. O custo dos nutrientes foi calculado por grama para 10 m^3 para padrão e 5 m^3 para o meio reciclado.

TABELA 13 - CUSTO DO MEIO PADRÃO E MEIO RECICLADO

	Meio Padrão		**Meio Reciclado (3x)**	
Variáveis	**Quantidade**	**Preço (R$)**	**Quantidade**	**Preço**
Nutrientes (g)	28.892,52	280,20	18.057,83	175,12
Água (m^3)	40	29,4	25	40,36
Esgoto (m^3)	40	24,99	25	32,89
Total		**579**		**382**

Reciclando o meio de cultivo tres vezes e possível ecomizar 62% com nutrientes, 69% com água e efluente.

6. CONCLUSÃO

Essa pesquisa avaliou o efeito da reciclagem repetida no cultivo da microalga *Scenesdesmus* sp.em termos de crescimento, quantidade de biomassa, concentração de lipídeos e consumo de nutrientes. Foi definido que seria reutilizado 50% do meio clarificado. Com os resultados obtidos, conclui-se que:

- O crescimento da microalga *Scenedesmus* sp.em meio de cultivo reutilizando 50% do clarificado foi maior;
- A produção de biomassa seca e o conteúdo lipídico da microalga aumentaram em todos os cultivos onde foi reutilizado o clarificado, quando comparados aos cultivos realizados com o meio padrão.
- Alguns dos nutrientes analisados, como o potássio, o fosfato e o ferro, foram consumidos parcialmente em todos os reciclos; somente o nitrato foi consumido totalmente em todos os reciclos e inclusive no meio padrão;
- O perfil lipídico dos reciclos apresentou baixa porcentagem de AGPI, melhorando assim as características do ácido graxo.
- Este trabalho tem grande relevância para a produção de microalgas, pois os resultados mostraram que a reciclagem do meio de cultivo permite reduzir os gastos com os nutrientes necessários para o cultivo de microalgas e também reduz o consumo de água potável, oferecendo assim novas perspectivas para a produção de biodiesel a partir de lipídeos de microalgas.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Repetir esta pesquisa para as condições do fotobiorreator do NPDEAS;
- Reproduzir o mesmo experimento dessa pesquisa com outras espécies de microalgas;
- Determinar o limite de reciclagem do meio de cultivo que permite o crescimento da microalga
- Calcular a viabilidade de reciclar um volume maior do meio de cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOCS International, Official methods of analysis. Calculated Iodine Value: Cd 1c-85 (1997).

AOCS International. 1997. Official methods of analysis. Calculated Saponification Value: Cd 3a -94

AOCS. Official methods and recommended practices of the american oil chemists' society. 4thed. Champaign: R.E. Walker, American Oil Chemists' Society, Ce 2-66 1990.

AHMAD, A. L. *et al*. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, p. 584-593, 2011.

ALGAE. Disponivel em: <**algaeforbiofuels.com**>. Acesso em: 15 out. 2012.

ALGAE. Disponivel em:< protist.i.hosei.ac.jp>**Scenedesmus** Acesso em: 18 Abril 2013.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. Cultivo da Microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciênc. agrotec.**v. 32, n. 5, p. 1551-1556, set / out. 2008.

ANVISA. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999, Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais, **Diário Oficial da República Federativa do Brasil,** Brasília, p. 82 -87, 1999.

AOCS. **Calculated Saponification**. AOCS International, p. Cd 3a-94, 1997.

BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Oleaginosas e seus óleos: vantagens e desvantagens para produção de biodiesel**. 1. ed. Campina Grande: EMBRAPA, 2008. Disponível em: <www.infoteca.cnptia.**embrapa**.br/bitstream/doc/276836/**1**/DOC201.pdf>. Acesso em: 04/01/2013.

BIOCOMBUSTÍVEIS.Disponível em:<www.brasil.gov.br/sobre/economia/energia/matriz-energetica/./print.>,2012 **Biocombustiveis Portal Brasil**>. Acesso em: 04 Fevereiro 2013.

BLIGH, G. E.; DYER, J. W. A. Rapid method of total lipid extraction and purification. **Jornal of Biochemistry and Physiology**, Canadian, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRASIL. RESOLUÇÃO ANP Nº 7, DE 19.3.2008 - DOU 20.3.2008 Disponível em: <nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll?f=id$id=RANP%207%20-%202008>. Acesso em: 09/01/2013.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biodiesel from microalgae - A review of technologies for production,processing, and estractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009, 2009.

CARDOSO, A. S; VIEIRA, G. E. G; MARQUES, A. K. Uso de microalgas para obtenção de biocombustíveis. **Revista Brasileira Biociências**, Porto Alegre, v. 9, p. 542 - 549, out/dez 2011.

CARVALHO JUNIOR, R. M. D. **Desenvolvimento e análise energética do processo de obtenção do Biodiesel de microalgas por metanólise IN SITU**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 99. 2010.

CEPPA. Validação de método analitico para analise de elementos químicos matriz água, Curitiba, p. 16, 2012.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, p. 12, 2007.

CORSINI, M. S. *et al*. **Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura.** *Quím. Nova*, vol.31, n.5, p. 956-961, 2008.

COSTA, T. L. **Caracteristicas Físicas e Físico - Química do óleo de duas cultivares de mamona**. Universidade Federal Campina Grande. Campina Grande-Paraíba, p. 113. 2006.

DANTAS, H. J. **Estudo Termoanalítico, Cinético e Reológico de Biodiesel Derivado do Óleo de Algodão (Gossypium hisutum)**. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p. 122. 2006.

DEMIRBAS, A. Biodiesel: a realistic fuel alternative for diesel engines. **Springer**, London, n. 1, 2008.

DERNER, R. B. *et al*. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959-1967, 2006.

DIAS, C. V; FIGUEIREDO, E; D'ELIA. E. **Avaliação da eficiência dos principais antioxidantes utilizados na indústria do biodiesel**. 5° Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. Salvador Bahia: [s.n.]. 2012.

FERRARI, R. A.; SOUZA, W. L. D. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 106-111, 2009.

FRANCISCO, E. C. *et al*. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbondioxide sequestration, lipid production and biofuel quality.**J ChemTechnol Biotechnol**, v. 85, p. 395 - 403. 2010.

GODINHO, L. R. *et al*. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). **Hoehnea**, p. 513-553, 2010.

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HARMER, U. T; KIM, W. H. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena* flos-aquae (Lingb.). Verh. Internat. **Verein Limnol**. (15): 769-780, 1964.

GUILLARD, R. R. L; RYTHER, J. H. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. pp 26-60. In Smith, W. L. and Chanley, M. H. (eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA, 1975.

GRIMA, E. M. E. A. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491-515, 2003.

HU, Q. *et al.* Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The plant**, v. 54, p. 621-639, May 2008.

HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products-major industrial especies; Arthrospira (Spirulina) platensis.In:RICHMOND,A.(ED).Handbook of microalgal culture. **Biotechnology and applied phycology.Oxford**, p. 264-272, 2004.

HUANG, G. H. *et al*.Biodiesel production by microalgal biotecnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010.

HUNDT, K.; REDDY, B. V. Algal biodiesel production from power plant exhaust and its potential to replace petrodiesel and reduce greenhouse gas emissions. **International Journal of Low-Carbon Technologies**, v. 6, p. 294-298, 2011.

JORGE, N.; LUZIA, D. M. M. Caracterização do óleo das sementes de Pachira aquatica Aublet para aproveitamento alimentar. **Química,Alimentos,Microbiologia**, Manaus, v. 42, Março 2012.

KIM. D. G. *et al*.Harvest of Scenedesmus sp. with bioflocculant and reuse of culture medium for subsequent high-density cultures. **Bioresource Technology**, p. 3163-3168, 2011.

KNIE, J.; LOPES, E. **Testes ecotoxicologicos;métodos,técnicas e aplicações** 20.ed. Florianópolis: fatma/gtz, 2004.

LEMOS, J. S. **Desenvolvimento de sistema de tratamento e reciclagem de meio de cultivo de microalgas para produção de biodiesel**. UFPR. Curitiba, p. 85. 2012.

LIMA, M. *et al*. **Emissão de gases de efeito estufa provenientes da queima de resíduos agrícolas no Brasil**. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna ,1999.

LIU, Z.; WANG, G.; ZHOU, B. Effect or iron on growth and lipid accumulation in Chlorella vulgaris. **Bioresource Technology,** v. 99, p. 4717-4722, 2008.

LOERA-QUEZADA, M. M.; OLGUÍN E.J., O. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. **Revista Latino americana de Biotecnologia Ambiental y Algal**, v. 1, p. 91-116, Maio 2010.

LOURENÇO, S. **Cultivo de microalgas Marinhas- principios e aplicações.**São Carlos: Rima, 2006.

LOPES, S.. **Bio**. 1. ed., São Paulo: Saraiva, 2004.

LOZANO, P. *et al*. Measurement of free glycerol in biofuels. **Fresellius J. Anal. Chem**, p. 319-322, 1996.

MAKAREVICIENE, V*. et al*. Cultivation of Microalgae Chlorella sp. and Scenedesmus sp. as a Potentional Biofuel Feedstock. **Environmental Research, Engineering and Management**, p. 21-27, 2011.

MALLICK, N. *et al.* Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel.**J ChemTechnol Biotechnol**, v. 87, p.137 - 145, 2012.

MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus*as a potential source for biodiesel production.**Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, p. 281 - 291, 2009.

MASOJÍDEK, J., KOBLÍZEK,M., TORZILLO, G., Photosynthesis in microalgae.In: Handbook of microalgal culture. **Biotechnology and applied phycology. 1 ed., Oxford**, Ed.Blackwell Science Ltd., p. 19 - 20, 2004.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: **A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2009.

MELLO, C. T. *et al*. **Efeito econômico da utilização de fertilizantes como substrato no cultivo de microalgas**. Trabalho apresentado no 5º Congresso Internacional de Bioenergia. Curitiba: [s.n.]. 2010.

MELO, M. A. M. F. **Avaliação das propriedades de óleos vegetais visando a produção do Biodiesel**. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p. 114. 2010.

MENG, X. *et al*. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, China, p. 1-5, 2009.

MIAO, X. e. WU. Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 841-846, 2006.

MORAIS, K. C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga Phaeodactylum tricornutum em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 95. 2011.

NATUREZA ecologica.Disponível em:<**www.oilgae.com/algae/cult/op/op.html**>. Acesso em: 03 jan. 2013.

PANKOWSKI, A.; MCMINN. Development of immunoassays for the iron-regulated proteins ferrodoxin and flavodoxin in polar microalgae. **J.Phycol**, v. 45, p. 771-783, 2009.

PENTEADO, D. M. R. **Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga Phaeodactylum tricornutum para a produção de lipídeos.**Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 114. 2010.

PIORRECK, M., BAASCH, K. H., POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, 23 (2), 207-216, 1984.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: um projeto de sustentabilidade econômica e socioambiental para o Brasil. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REDA, S. Y.; COSTA, B.; SOSSELA, R. **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel:** livro de resumos. Biodiesel. Brasília, Brasil: [s.n.]. 2007.
Revista Biodiesel. Disponivel em:<www.revistaanalytica.com.br/ed_anteriores/57/analytica.pdf, 2009>. Acesso em: 28.12.2012 Dezembro 2012.

RIBEIRO, R. L. E. A. The temperature response of compact tubular microalgae photobioreactors. **Engenharia térmica**, v. 8, p. 50-55, 2009.

RIBEIRO, R. L. L.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. **Estimativa da produção de biodiesel a partir de microalgas em fotobiorreatores tubulares compactos do NPDEAS**. 5º Congresso da rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. Salvador: [s.n.]. 2012.

RICHMOND, A., GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. Biomass, v 10, 253-264, 1986.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRC Press. ISBN 0-8493-3240-0, 1990

RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture. **Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Publishing, Oxford, 566 p.2004.

RODOLFI, L. E. A. Growth medium recycling in Nannochloropsis sp. mass cultivation. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 243-248, 2003.

RODOLFI, L*. et al*. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 1, p. 100 - 112, 2009.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. W., HERDMAN, M. & STANIER, R. G.Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. **J.Gen. Microbiol**. 111, 1-61, 1979.

SANCHEZA, E*. et al*. Biodiesel from microalgae oil production in two sequential. **Chemical Engineering**, p. 211-216, 2011.

SIEGEL, S. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento.** Bookman, Porto Alegre, 2008.

SCHMIDT, C. J. B.. Aislamiento, purificación, y mantenimiento de cepas de microalgas. In: VEGA, B.O.A.; VOLTOLINA, D. **Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal.** 1. ed. La Paz: Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR), 2007. p 1 - 16.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regime de cultivo**. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 107. 2010.

STANDARD METHODS **for the examination of water and wasterwater**. 21. ed. Washington: [s.n.], 2005.

TABATABAEIA, M*.* et al*.*Biodiesel production from genetically engineered microalgae:Future of bioenergy in Iran. **Renewable and Sustainable Energy Review**, p. 1918-1927, 2011.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) **physiology, cell-biology and biotechnology.** London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

WU, Z. *et al*. Evaluation of flocculation induced by pH increase for harvesting microalgae and reuse of flocculated medium. **Bioresource Technology**, China, p. 496-502, 2012.

XIN, L. *et al*. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga Scenedesmus sp.under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, China, p. 3098-3102, 2011.

XU, H. Miao. X.; Wu. Q. High quality biodiesel production from a microalga Chlorella protothecoides by heterotrophic growth in fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 126, p. 499-507, 2006.

ZIAMBI, R. C.et al. Fatty acid composition of vegetable oils and fats. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 111-120, jan./jun. 2007.

ANEXO 1

PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE NUTRIENTES EM ÁGUAS

1. ANÁLISE DE NITRATO

Previamente e determinado o nitrito, conforme a seção 2 deste anexo e na sequencia e realizado a redução do nitrato a nitrito por meio de uma coluna de cádmio.

1.1 EQUIPAMENTOS

- ✓ Balança analítica eletrônica;
- ✓ Bomba a vácuo;
- ✓ Espectrofotômetro UV Visível para uso em 543 nm;
- ✓ pHmetro;
- ✓ Refrigerador.

1.2 MATERIAIS

- ✓ Filtro membrana, poro 0,45 μm;
- ✓ Balão volumétrico 50, 100 e 1000 ml;
- ✓ Béquer 50, 100 e 1000 ml;
- ✓ Cubeta, 1 cm de caminho óptico;
- ✓ Erlenmeyer 125 ml;
- ✓ Funil de vidro;
- ✓ Kitassato 250 e 1000 ml;
- ✓ Pipeta graduada 5ml;
- ✓ Pipeta volumétrica 5, 25 e 50 ml;
- ✓ Proveta 100 ml;
- ✓ Dessecador.

1.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

- ✓ Solução Tiossulfato de Sódio ($Na_2S_2O_3.5H_2O$);
- ✓ Solução de Cloreto de Amônio-EDTA (NH_4Cl-$C_{10}H_{14}N_2.2H_2O$);

- ✓ Solução diluída de Cloreto de Amônio – EDTA (NH_4Cl-$C_{10}H_{14}N_2.2H_2O$);
- ✓ Ácido Clorídrico (HCl) 6 M;
- ✓ Solução de Sulfato de Cobre ($CuSO_4.5H_2O$) 2%;
- ✓ Solução Estoque de Nitrato (KNO_3) 100 mg NO_3^--N/L;
- ✓ Solução Intermediária de Nitrato (KNO_3) 10 mg NO_3^--N /L;
- ✓ Grânulos de Cádmio.

1.4 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Realizar a análise com amostras e soluções reagentes à temperatura ambiente.

1.5 PRECAUÇÕES

Usar Equipamento de Proteção Individual (luvas e óculos) durante o manuseio das amostras e execução da análise.

1.6 PREPARO DE SOLUÇÕES

Para o preparo de todas as soluções e diluições usar água ultrapurificada.

1.6.1 Solução de Tiossulfato de Sódio

Pesar 3,5 g de tiossulfato de sódio pentahidratado e dissolver em água ultrapurificada e avolumar para 1000 ml. Preparar semanalmente. Adicionar 1 ml desta solução para remover 1 mgL^{-1} de cloro residual em 500 ml de amostra. Validade: 1 ano

1.6.2 Reagente de Cor

Para 400 ml de água ultra purificada, adicionar 50 ml de ácido fosfórico 85% e 5 g de sulfanilamida, $C_6H_8N_2O_2S$ p.a. Após dissolver a sulfanilamida completamente, adicionar 0,5 g de dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina (dihidrocloreto NED), $C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2$. $2HCl.CH_3OH$ p.a. Misturar para dissolver e avolumar para 500 ml. Validade: 1 mês quando armazenada em um frasco âmbar e mantida no refrigerador.

1.6.3 Solução de Cloreto de Amônio-EDTA

Dissolver 13 g de NH_4Cl e 1,7 g de EDTA (etilenodiaminotetraacéticodisódico) em 900 ml de água. Ajuste o pH para 8,5 com NH_4OH concentrado e diluir para 1 L. Validade: 6 meses.

1.6.4 Solução Diluída de Cloreto de Amônio-EDTA

Dilua 300 ml da solução NH_4Cl-EDTA para 500 ml com água . Validade: 6 meses.

1.6.5 Solução Estoque de Nitrato 100 mg NO_3-N/L

Secar a 105°C o nitrato de potássio KNO_3 por 24 horas. Dissolver 0,7218 g em água de diluir para 1000 ml. Preservar com 2 ml $CHCl_3$/L. Esta solução é estável por até 6 meses.

1.6.6 Solução Intermediária de Nitrato 10 mg NO_3-N/L

Dilua 100 ml da solução estoque de nitrato para 1000 ml com água. Preservar com 2 ml $CHCl_3$/L. Esta solução é estável por até 6 meses.

1.6.7 Ácido Clorídrico 6M

Misturar 200 ml de ácido clorídrico concentrado com 200 ml de água destilada. Validade: 1 ano.

1.6.8 Solução de Sulfato de Cobre 2%

Dissolver 20 g de $CuSO_4.5H_2O$ em 500 ml de água e dilua para 1000 ml. Validade: 1 ano.

1.6.9 Grânulos de Cobre Cádmio

Lavar 25 g de grânulos de cádmio novo ou usado de 20 a 100 mesh, com HCl 6 M (com uma quantidade suficiente para cobrir os grânulos) e enxaguar com água. Adicionar 100 ml e solução $CuSO_4$ 2% ao cádmio e agitar gentilmente (sem bastão de vidro) por 5 minutos ou até o aparecimento de uma cor azul fraca.

Decante e repita com uma nova solução de $CuSO_4$ 2% até o precipitado coloidal marrom começar a desenvolver. Gentilmente lave com água destilada (pelas paredes para não decompor os grânulos) até remover todo precipitado de cobre.

1.7 EXECUÇÃO ENSAIO

1.7.1 Ajuste do Espectrofotômetro

✓ Ligar o aparelho e permitir um aquecimento durante 30 minutos;

✓ Ajustar o comprimento de onda em 543 nm;

✓ Zerar o aparelho em absorbância com água ultra purificada, em seguida, com o branco.

1.7.2 Preparo da Coluna Redutora de Cobre-Cádmio

✓ Inserir, na parte de baixo da coluna, uma pequena quantidade de lã de vidro e preencher com água. Adicionar quantidade suficiente de grânulos para formar uma coluna de aproximadamente 18,5 cm. Manter o nível de água acima dos grânulos para prevenir entrada de ar;

✓ Lave a coluna com 200 ml da solução diluída de NH_4Cl-EDTA. Ativar a coluna passando através dela pelo menos 100 ml de uma solução composta de 25 ml de solução padrão de nitrato de 1 mg L^{-1} e 75 ml de NH_4Cl-EDTA.

1.7.3 Preparo da Curva Padrão

✓ Preparar nova curva a cada vez que forem preparados novos reagentes;

✓ Antes do preparo da curva adicionar 50 ml da solução diluída de NH_4Cl-EDTA na coluna e deixe passar pelo sistema;

✓ Usar a solução intermediária de nitrato 10 mg NO_3-N/L, para preparar uma curva numa faixa de 0,05 a 1,0 mg NO_3-N/L, fazendo diluições para 100 ml.

Concentração de Nitrato (mg $NO_3^-.L^{-1}$ em N)	**Volume (ml) de solução intermediária com 10 mg de $NO_3^-.L^{-1}$ em N**
0,05	0,5
0,10	1,0
0,20	2,0
0,30	3,0
0,50	5,0
0,80	8,0
1,00	10,0

1.7.4 Procedimento

- ✓ Realizar previamente a análise de nitrito da amostra (seção 2 do anexo 1);
- ✓ Se a amostra for turva, filtrar a vácuo usando membrana de 0,45 μm de poro para um kitassato de 250 ml;
- ✓ Caso haja cloro residual, adicionar 1ml de tiossulfato de sódio para remover 1 mg.L-1 de cloro residual em 500 ml de amostra;
- ✓ Ajustar o pH entre 7 e 9;
- ✓ Antes do início do ensaio, adicionar 50 ml da solução diluída de NH_4Cl-EDTA na coluna e deixe passar pelo sistema;
- ✓ Para preparo do padrão, pipetar uma porção de 5ml do padrão de 10 mg NO_3^- N/L e avolumar para 100 ml. Transferir uma alíquota de 25 ml para erlenmeyer de 250 ml, adicionar 75 ml da solução de NH_4Cl-EDTA e homogeneizar.
- ✓ Adicionar a mistura dentro da coluna, descartar os primeiros 25 ml, deixando passar os 75 ml restantes. Tomar uma alíquota de 50 ml, transferindo-a para erlenmeyer de 250 ml. Adicionar, até 15 minutos depois da redução, 2ml do reagente de cor.
- ✓ Entre 10 minutos e 2 horas, determinar a absorbância em 543 nm.
- ✓ Para preparo do branco, transferir uma alíquota de 25 ml de água ultrapura para erlenmeyer de 250 ml, adicionar 75 ml da solução de NH_4Cl-EDTA e homogeneizar. Adicionar a mistura dentro da coluna, descartar os primeiros 25 ml, deixando passar os 75 ml restantes. Tomar uma alíquota de 50 ml, transferindo para erlenmeyer de 250 ml. Adicionar, até 15 minutos depois da redução, 2ml do reagente de cor.
- ✓ Entre 10 minutos e 2 horas, determinar a absorbância em 543 nm.
- ✓ Para o preparo da amostra, transferir uma alíquota de 25 ml para erlenmeyer de 250 ml, adicionar 75 ml da solução de NH_4Cl-EDTA e homogeneizar. Adicionar a mistura dentro da coluna, descartar os primeiros 25 ml, deixando passar os 75 ml restantes. Tomar uma alíquota de 50 ml, transferindo-a para erlenmeyer de 250 ml. Adicionar, até 15 minutos depois da redução, 2ml do reagente de cor.

✓ Entre 10 minutos e 2 horas, determinar a absorbância em 543 nm.

1.8 CÁLCULO E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

$$Nitrato\left(mgNO_3^- \cdot L^{-1} em\ N\right) = C \cdot FD - Nitrito$$

onde:

C = concentração da amostra em $mg.L^{-1}$

FD = fator de diluição.

1.9 PRECISÃO

Para determinação do nitrato, realiza-se paralelamente um padrão de nitrato 0,50 $mg.L^{-1}$, é aceitável uma variação de ± 0,03 $mg.L^{-1}$. Caso ultrapasse esta variação, repetir a análise.

1.10 REFERÊNCIA

CADMIUM Reduction Method. In: STANDARD Methods for the examination of water and Wasterwater. 21thed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005. p. 4: 123 - 125 (Method 4500-NO_3^- E).

2. ANÁLISE DE NITRITO

2.1 EQUIPAMENTOS

- ✓ Agitador magnético;
- ✓ Balança analítica eletrônica;
- ✓ Bomba a vácuo;
- ✓ Bureta de 25 ml;
- ✓ Chapa de aquecimento;
- ✓ Espectrofotômetro UV Visível;
- ✓ Refrigerador;
- ✓ Filtro membrana, 0,45 μm;
- ✓ Balão volumétrico 50, 100 e 1000 ml;
- ✓ Béquer 50, 100 e 1000 ml;
- ✓ Cubeta, 1 cm de caminho óptico;
- ✓ Erlenmeyer 125 ml;
- ✓ Erlenmeyer 250 ml, com tampa;
- ✓ Funil de vidro;
- ✓ Kitassato 250 e 1000 ml;
- ✓ Pipeta graduada 5ml;
- ✓ Pipeta volumétrica 5 e 50 ml;
- ✓ Proveta 100 e 1000 ml;
- ✓ Papel indicador universal.

2.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

- ✓ Solução Padrão Estoque de Nitrito ($NaNO_2$) 250 mg L^{-1};
- ✓ Solução Padrão Intermediária de Nitrito ($NaNO_2$) 50 mg L^{-1};
- ✓ Solução Padrão Uso de Nitrito ($NaNO_2$) 0,5 mg L^{-1};
- ✓ Solução de tiossulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$);
- ✓ Solução de permanganato de potássio ($KMnO_4$) 0,01 M;
- ✓ Solução padrão de oxalato de sódio ($Na_2C_2O_4$) 0,025 M;
- ✓ Solução de ácido clorídrico (HCl) 1 M;
- ✓ Solução de hidróxido de amônio (NH_4OH) 1M;
- ✓ Reagente cor.

2.3 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Realizar a análise com amostras e soluções reagentes à temperatura ambiente.

2.4PRECAUÇÕES

Usar Equipamento de Proteção Individual (luvas e óculos), durante o manuseio das amostras e execução do ensaio.

2.5 PREPARO DE SOLUÇÕES

Usar água ultrapurificada para preparo de todas as soluções e diluições.

2.5.1 Solução Padrão Estoque de Nitrito 250 mg.L-1

Dissolver 1,232 g de nitrito de sódio p.a., em água ultrapurificada e diluir para 1000 ml. Preservar com 1 ml de clorofórmio, $CHCl_3$, p.a. 1 ml = 0,25 mg N.

Observação: em razão de o nitrito oxidar rapidamente na presença de umidade, usar um frasco âmbar limpo e seco. Manter os frascos fortemente tampados contra o livre acesso de ar quando não estiver em uso. Validade 6 meses.

2.5.2 Padronização da Solução de Nitrito Estoque

Pipetar, na sequência, 50 ml de permanganato de potássio 0,01M, 5 ml de H_2SO_4 concentrado, e 50 ml de solução de NO_2^- estoque para dentro de um frasco de vidro tampado. Submersa a ponta da pipeta bem abaixo da superfície da solução ácida de permanganato enquanto se adiciona solução de nitrito estoque. Agite gentilmente e aqueça para 70 a 80ºC em uma chapa quente. Descolorar a cor de permanganato pela adição de suficientes porções de 10 ml do oxalato de sódio 0,025 M. Titule o excesso de oxalato de sódio até o aparecimento de um rósea pálido. Conduza um branco com água através do procedimento inteiro e faça as necessárias correções no calculo final como mostra na equação abaixo.

Calcule a conteúdo de NO_2^- em N da solução estoque pela seguinte equação:

$$A = \frac{[(B \cdot C) - (D \cdot E)] \cdot 7}{F}$$

onde:

A = mg NO_2^- -N/ml na solução de $NaNO_2$ estoque

B = total de $KMnO_4$ padrão usado

C = Normalidade de $KMnO_4$ padrão

D = total do redutante padrão adicional (oxalato)

E = Molaridade do redutante padrão (oxalato) .

F = ml de solução de $NaNO_2$ estoque tomada para titulação.

1ml de $KMnO_4$ 0,01 M consumido pela solução de $NaNO_2$ corresponde a 1750 μg de NO_2^- em N.

2.5.3 Solução Padrão Intermediária de Nitrito 50 mgL^{-1}

Calcule o volume, G, da solução de NO_2^-estoque requerida para a solução de NO_2^- intermediária de G = 12,5/A. Dilua o volume G (aproximadamente 50 ml) para 250 ml com água ultrapurificada; 1 ml = 50 μg de N. Prepare diariamente.

2.5.4 Solução Padrão Uso de Nitrito 0,5 mgL^{-1}

Dilua 10 ml da solução de NO_2^- intermediária para 1000 ml com água ultra purificada; 1 ml = 0,5 μg de N. Prepare diariamente.

2.5.5 Solução de Tiossulfato de Sódio

Pesar 0,35 g de tiossulfato de sódio pentahidratado p.a. Dissolver e avolumar com água destilada para balão volumétrico de 100 ml. Validade: 1 ano.

2.5.6 Solução de Ácido Sulfúrico - 1:1

Colocar em um béquer aproximadamente 500 ml de água destilada. Adicionar, lentamente e com agitação, 465 ml de ácido sulfúrico concentrado, d = 1,84 p.a 95 - 98 % e avolumar para 1000 ml. Validade de 1 ano.

2.5.7 Titulante Padrão de Permanganato de Potássio 0.01 M

Dissolver 1,6 g de permanganato de potássio p.a, em 1000 ml de água ultra purificada. Manter em um frasco âmbar e deixar em repouso por pelo menos 1

semana. Cuidadosamente, decantar ou pipetar o sobrenadante sem agitar qualquer sedimento. Validade: 6 meses. Padronizar esta solução mensalmente.

2.5.8 Padronização do Titulante Padrão de Permanganato de Potássio 0.01 M

Pesar, em triplicata, quantidades de 0,1 g de oxalato de sódio anidro, em copos de béquer de 400 ml. Para cada béquer, adicionar 100 ml de água ultra purificada e agitar para dissolver. Adicionar 10 ml de solução de ácido sulfúrico 1:1 e aquecer rapidamente para 90ºC a 95ºC. Titular rapidamente com solução de permanganato a ser padronizado, enquanto agitando, para uma leve cor rósea que persista por pelo menos 1 minuto. NOTA 1: Não permita que a temperatura caia abaixo de 85 ºC. Se necessário, aquecer o conteúdo do béquer durante a titulação.

Para cada 0,1 g de oxalato de sódio, consume aproximadamente 6 ml da solução.

Fazer uma prova em branco paralelamente, no qual não se pesa o oxalato de sódio, somente água e ácido sulfúrico.

$$Normalidade\ de\ KMNO_4 = \frac{g\ de\ NA2C2O4}{(A - B) * 0{,}33505}$$

onde:

A = ml de titulante para amostra,

B = ml de titulante para branco.

2.5.9 Solução Padrão de Oxalato de Sódio 0,025M

Dissolva 3,35 g de oxalato de sódio p.a, em água e dilua para 1000 ml. Validade: 6 meses

2.5.10 Solução de Ácido Clorídrico1 M

Diluir 85 ml de ácido clorídrico concentrado p.a., a 1000 ml com água destilada. Validade: 1 ano.

2.5.11 Solução de Hidróxido de Amônio1 M

Diluir 67 ml de hidróxido de amônio concentrado p.a., a 1000 ml com água destilada. Validade de 1 ano.

2.5.12 Reagente Cor

Para 400 ml de água ultra purificada, adicionar 50 ml de ácido fosfórico 85% e 5 g de sulfanilamida, $C_6H_8N_2O_2S$, p.a. Após dissolver a sulfanilamida completamente, adicionar 0,5 g de dihidrocloreto de N-(1-naftil)-etilenodiamina (dihidrocloreto NED), $C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH_2.2HCl.CH_3OH$, p.a. Misturar para dissolver e avolumar para 500 ml. Validade: 1 mês quando armazenada em um frasco âmbar e mantida no refrigerador.

2. 6 EXECUÇÃO DO ENSAIO

2.6.1 Ajuste do Espectrofotômetro

✓ Ligar o aparelho e permitir um aquecimento por 30 minutos;

✓ Ajustar o comprimento de onda em 543 nm;

✓ Zerar o aparelho em absorbância com água ultra purificada, em seguida, com o branco.

2.6.2 Preparo da Curva Padrão

✓ Preparar nova curva a cada vez que forem preparados e/ou utilizados novos reagentes;

✓ Preparar os padrões de nitrito utilizando os volumes da solução padrão uso de nitrito 0,5 $mg.L^{-1}$ conforme o quadro abaixo, avolumando a seguir para 50 ml com água ultra purificada;

Concentração de Nitrato (mg de $NO_2^-L^{-1}$ em N)	**Volume (ml) de solução padrão de 0,5 $mg.L^{-1}$ de nitrito**
BRANCO	0
0,01	1,0
0,02	2,0
0,04	4,0
0,06	6,0
0,08	8,0
0,10	10,0
0,18	18,0
0,20	20,0

✓ Homogeneizar os padrões vigorosamente e transferir para erlenmeyer de 125 ml;
✓ Adicionar 2 ml de reagente cor;
✓ Homogeneizar e aguardar entre 10 minutos a 2 horas para máximo desenvolvimento de cor;
✓ Determinar a absorbância dos padrões em comprimento de onda de 543 nm, usando uma cubeta de 1 cm de caminho óptico;

2.6.3 Procedimento

✓ Se a amostra contiver sólidos suspensos, filtrar a vácuo uma porção adequada através de uma filtro membrana de 0,45 μm de poro para um kitassato de 250 ml;
✓ Para eliminar a presença de cloro, adicionar 1 ml de solução de tiossulfato de sódio para cada 1 $mg.L^{-1}$ de cloro residual;
✓ Se o pH da amostra não estiver entre 5 a 9, ajustar a esta escala com solução de ácido clorídrico 1 M ou solução de hidróxido de amônio 1 M, utilizando papel indicador universal;
✓ Para o preparo do branco, medir com pipeta volumétrica 50 ml de água destilada, e transferir para erlenmeyer de 125 ml;
✓ Para o preparo do padrão de 0,05 $mg.L^{-1}$, medir com pipeta volumétrica 5 ml da solução padrão uso de nitrito de 0,5 $mg.L^{-1}$, em balão de 50 ml. Avolumar com água e transferir para erlenmeyer de 125 ml;
✓ Medir 50 ml de amostra, ou porção diluída para 50 ml com água e transferir para erlenmeyer de 125 ml;
✓ Prosseguir para o branco e padrão como a amostra;
✓ Adicionar 2 ml de reagente cor;
✓ Homogeneizar e aguardar entre 10 minutos a 2 horas para máximo desenvolvimento de cor;
✓ Determinar a absorbância da amostra em comprimento de onda de 543 nm, usando uma cubeta de 1 cm de caminho óptico.

2.7 CÁLCULO E EXPRESSÃO DO RESULTADO

$$Nitrito\left(mgNO_2^- \cdot L^{-1} em\ N\right) = C \cdot FD$$

onde:

C = concentração da amostra em $mg.L^{-1}$

FD = fator de diluição.

2.8 PRECISÃO

Para analise de nitrito, determina-se paralelamente um padrão de 0,05 $mg.L^{-1}$, é aceitável uma variação de ± 0,02 $mg.L^{-1}$. Caso ultrapasse esta variação, repetir a análise.

2.9. REFERÊNCIA

COLORIMETRIC Method. In: STANDARD Methods for the examination of water and Wasterwater. 21th ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005. p. 4: 118-119 (Method 4500-NO_2^- B).

3. ANÁLISE DE FOSFATO

3.1 EQUIPAMENTOS

- ✓ Balança Analítica;
- ✓ Espectrofotômetro UV Visível para uso em 690 nm;
- ✓ Refrigerador.

3.2 MATERIAIS

- ✓ Pipeta graduada 10 ml;
- ✓ Erlenmeyer 250 ml;
- ✓ Balão volumétrico, 100 ml e 1000 ml.

3.3 REAGENTES E SOLUÇÕES

- ✓ Solução padrão estoque de fosfato (KH_2PO_4) 50 mg de $PO_4^{-3}.L^{-1}$ em P;
- ✓ Solução padrão uso de fosfato (KH_2PO_4) 5 mg de $PO_4^{-3}.L^{-1}$ em P;
- ✓ Solução de fenolftaleína [$C_6H_4COO.C(C_6H_4OH)_2$];
- ✓ Solução de ácido forte (H_2SO_4 + HNO_3);
- ✓ Solução molibdato de amônio $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$. $4H_2O$;
- ✓ Solução de cloreto estanoso ($SnCl_2$. $2H_2O$).

3.4 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Realizar a análise com amostras e soluções e reagentes à temperatura ambiente.

3.5 PRECAUÇÕES

Usar Equipamentos de Proteção Individual (luvas e óculos), durante o manuseio das amostras, e execução das análises.

3.6 PREPARO DE SOLUÇÕES

3.6.1 Solução Padrão Estoque de Fosfato - 50 mgL^{-1}

Pesar 0,2195 g de fosfato monobásico de potássio anidro p.a. Dissolver em água destilada e avolumar para 1000 ml. Validade de 6 meses.

3.6.2 Solução Padrão de Fosfato - 5 mgL^{-1}

Transferir com pipeta volumétrica 100 ml da solução padrão estoque de fosfato de 50 $mg.L^{-1}$ para balão volumétrico de 1000 ml. Avolumar com água destilada. Validade de 6 meses.

3.6.3 Solução Indicadora de Fenolftaleína

Dissolver 1 g de fenolftaleína p.a em 60 ml de álcool etílico e diluir com água destilada até 100 ml. Validade de 1 ano.

3.6.4 Solução de Ácido Forte

Em balão volumétrico de 1000 ml contendo aproximadamente 600 ml de água destilada, adicionar cuidadosamente 300 ml de ácido sulfúrico concentrado. Após resfriamento, acrescentar 4 ml de ácido nítrico concentrado e avolumar com água destilada. Validade de 1 ano.

3.6.5 Solução de Molibdato de Amônio

Dissolver 25 g de molibdato de amônio tetrahidratado p.a em 175 ml de água destilada.

Adicionar cuidadosamente 280 ml de ácido sulfúrico concentrado em 400 ml de água destilada.

Após resfriamento da solução ácida, adicionar a solução de molibdato de amônio e avolumar com água destilada para balão volumétrico de 1000 ml. Validade de 6 meses.

3.6.6 Solução de Cloreto Estanoso

Pesar 2,5 g de cloreto estanoso dihidratado p.a e dissolver em 100 ml de glicerol $C_3H_3(OH)_3$ p.a . Aquecer em banho-maria e agitar com bastão de vidro até completa dissolução. Validade: 6 meses.

3.7 EXECUÇÃO DO ENSAIO

3.7.1 Ajuste do Espectrofotômetro

✓ Ligar o aparelho e permitir aquecimento por 30 minutos;

✓ Ajustar o comprimento de onda em 690 nm;

✓ Zerar o aparelho em absorbância com água destilada e com o branco;

3.7.2 Preparo da Curva Padrão

✓ Preparar nova curva a cada vez que forem preparados e/ou utilizados novos reagentes;

✓ Preparar os padrões de fosfato utilizando os volumes da solução padrão de fosfato de 5 $mg.L^{-1}$ relacionados conforme o quadro abaixo, avolumando, a seguir, para 100 ml com água destilada.

Concentração de Fosfato (mg de $PO_4^{-3}.L^{-1}$)	**Volume da solução padrão de fosfato de 5 $mg.L^{-1}$ (ml)**
Branco	-
0,05	1
0,10	2
0,20	4
0,30	6
0,50	10
0,75	15
1,00	20
1,25	25
1,50	30
2,00	40

✓ Transferir o branco e padrões para erlenmeyer de 250 ml;

✓ Adicionar 4 ml de solução de molibdato de amônio e agitar vigorosamente;

✓ Adicionar 10 gotas (0,5 ml) de solução de cloreto estanoso e agitar;

✓ Entre 10 - 12 minutos, determinar a absorbância em 690 nm usando cubeta de 1 cm;

3.7.3 Procedimento

✓ Caso a amostra seja turva filtrar em membrana 0,45 µm de poro;

✓ Para o preparo do branco, medir 100 ml de água destilada e transferir para erlenmeyer de 250 ml;

✓ Para preparo do padrão de 1 $mg.L^{-1}$, medir com pipeta volumétrica 20 ml da solução padrão uso de fosfato 5 $mg.L^{-1}$, em balão de 100 ml avolumar com água destilada. Transferir para erlenmeyer de 250 ml;

✓ Adicionar 100 ml da amostra para um erlenmeyer de 250 ml. Adicionar 1 gota de fenolftaleína, se desenvolver cor rósea forte neutralizar com ácido forte. Se forem necessárias mais que 5 gotas, tomar uma porção diluída da amostra;
✓ Prosseguir para o branco e o padrão como a amostra;
✓ Adicionar 4 ml de solução de molibdato de amônio e agitar vigorosamente;
✓ Adicionar 10 gotas (0,5 ml) de solução de cloreto estanoso e agitar;
✓ Entre 10-12 minutos, determinar a absorbância em 690 nm usando cubeta de 1 cm.

3.8 CÁLCULO E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

$$Fosfato\,(mg\ de\ PO_4^{-3} \cdot L^{-1} em\ P) = C \cdot FD$$

onde:

C = concentração da amostra em mg.L^{-1}

FD = fator de diluição.

.

3.9 PRECISÃO

Para analise de fosfato determina-se paralelamente um padrão de fosfato de 1 mg L^{-1}, é aceitável uma variação de ±0,05 mg L^{-1}. Caso ultrapasse esta variação, repetir a análise.

3.10 REFERÊNCIA

STANNOUS CHLORIDE. Method. In: STANDARD Methods for the examination of water and Wasterwater. 21thed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005. p. 4: 152-153 (Method 4500-P D).

ANEXO 2

PROTOCOLO PARA ANÁLISE DO CONTEÚDO METABÓLICO DE MICROALGAS

1 ANÁLISE DE BIOMASSA SECA

Para determinar a biomassa seca dos cultivos de microalga foi utilizada a metodologia de análise de sólidos suspensos totais do *Standard Methods*.

1.1 EQUIPAMENTOS

- ✓ Balança analítica eletrônica;
- ✓ Bomba a vácuo;
- ✓ Estufa;
- ✓ Refrigerador.

1.2 MATERIAIS

- ✓ Acessório para filtração;
- ✓ Cápsula de porcelana 100 ml;
- ✓ Papel filtro de fibra de vidro;
- ✓ Dessecador;
- ✓ Kitasato 250 ml;
- ✓ Pipetas;
- ✓ Proveta 50 ml.

1.3 CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Realizar análise com amostras e soluções reagentes à temperatura ambiente.

1.4 PRECAUÇÕES

Usar Equipamento de Proteção Individual (luvas e óculos), durante o manuseio das amostras e execução da análise.

1.5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

1.5.1 Preparo da Cápsula

✓ Ligar a estufa, aguardar estabilizar a temperatura a 103 ± 5°C;

✓ Colocar papel filtro de fibra de vidro na aparelhagem de filtração com a face enrugada voltada para cima umedecê-lo com água destilada e montar a aparelhagem;

✓ Colocar 20 ml de água destilada no funil, aplicar vácuo e deixar filtrar completamente. Repetir mais duas vezes a lavagem do filtro;

✓ Interromper a sucção e descartar a água de lavagem;

✓ Colocar o papel filtro de fibra de vidro em cápsula de porcelana limpa e seca;

✓ Colocar a cápsula com o papel filtro de fibra de vidro na estufa por no mínimo 1 hora;

✓ Deixar a cápsula com o papel filtro de fibra de vidro esfriar no dessecador por 30 minutos;

✓ Pesar a cápsula com o papel filtro de fibra de vidro e anotar o resultado em g (P_1);

✓ Repita o ciclo de secagem, resfriamento e pesagem até peso constante obtido variação de ± 0,05 mg;

1.5.2 Processamento da Amostra de Biomassa

✓ Montar a aparelhagem de filtração;

✓ Colocar o papel filtro de fibra de vidro na aparelhagem de filtração e umedecê-lo com água destilada e aplicar vácuo;

✓ Homogeneizar amostra do cultivo com agitador magnético. Escolher um volume de amostra que produza uma biomassa entre 0,0025 e 0,2 g. Pipetar o volume durante a homogeneização escolha um ponto médio do recipiente, mas não no vortex;

✓ Verter para a aparelhagem de filtração a porção homogênea de volume adequado de amostra. Deixar filtrar completamente. Se a filtração completa levar mais de 10 minutos, aumentar o diâmetro do filtro ou diminuir o volume de amostra;

✓ Após filtração, completa lavar o filtro com três sucessivos volumes de 10 ml de água destilada, aguardar até completa secagem do papel filtro;

- ✓ Interromper a sucção;
- ✓ Retirar cuidadosamente com uma pinça metálica, o papel filtro de fibra de vidro, colocar na cápsula, levar a estufa com temperatura de 103 ± 5 °C por 1 hora;
- ✓ Deixar a cápsula esfriar no dessecador por 30 minutos;
- ✓ Pesar a cápsula com a biomassa e anotar o resultado em g (P_2), voltar à cápsula na estufa por mais 1 hora, esfriar em dessecador e pesar. Repetir este procedimento até obter peso constante (variação de ± 0,05 mg).

1.5.3 CÁLCULO E EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

$$Biomassa\,seca\ \left(mg \cdot L^{-1}\right) = \frac{\left(P_2 - P_1\right)}{V} \cdot 1000000$$

onde:

P_1 = peso da cápsula com papel filtro fibra de vidro (g);

P_2 = peso da cápsula com papel filtro fibra de vidro e biomassa (g).

V = volume da amostra (ml).

1.6 PRECISÃO

As análises são realizadas em duplicata, é aceitável uma variação de ± 5 %. Caso ultrapasse esta variação repetir a análise.

1.7. REFERÊNCIAS

TOTAL Suspended Solids Dried at 103 -105 °C. In: STANDARD Methods for the examination of water and Wasterwater. 21th ed. Washington: APHA; AWWA; WEF, 2005. p. 2: 58 (Method 2540 D).

ANEXO 3

TABELA DE TARIFAS DE SANEAMENTO BÁSICO
CONTAS VENCÍVEIS A PARTIR DE 01 DE FEVEREIRO DE 2005

CATEGORIA / FAIXAS DE CONSUMO	TARIFA (Em Reais)

TARIFA SOCIAL

Todas as Localidades Operadas	ATÉ 10 m3	R$ + R$/m3 Excedente a 10m3
ÁGUA	5,00	5,00 + 0,50/ m3
ÁGUA E ESGOTO	7,50	7,50 + 0,75/ m3

TARIFA NORMAL

RESIDENCIAL	ATÉ 10 m3	R$ + R$/m3 Excedente a 10m3	R$ + R$/m3 Excedente a 30m3
ÁGUA Todas as Localidades Operadas	16,35	16,35 + 2,45/m3	65,35 + 4,18/m3
ESGOTO Curitiba e Maringá*	13,90	13,90 + 2,08/m3	55,55 + 3,55/m3
ÁGUA E ESGOTO Curitiba e Maringá*	30,25	30,25 + 4,53/m3	120,90 + 7,73/m3
ESGOTO Demais Localidades	13,08	13,08 + 1,96/m3	52,28 + 3,34/m3
ÁGUA E ESGOTO Demais Localidades	29,43	29,43 + 4,41/m3	117,63 + 7,52/m3

MICRO E PEQUENO COMÉRCIO	ATÉ 10 m3	R$ + R$/m3 Excedente a 10m3
ÁGUA Todas as Localidades Operadas	16,35	16,35 + 3,31/m3
ESGOTO Curitiba e Maringá*	13,90	13,90 + 2,81/m3
ÁGUA E ESGOTO Curitiba e Maringá*	30,25	30,25 + 6,12/m3
ESGOTO Demais Localidades	13,08	13,08 + 2,65/m3
ÁGUA E ESGOTO Demais Localidades	29,43	29,43 + 5,96/m3

COMERCIAL / INDUSTRIAL / UTILIDADE PÚBLICA	ATÉ 10 m3	R$ + R$/m3 Excedente a 10m3
ÁGUA Todas as Localidades Operadas	29,40	29,40 + 3,31/m3
ESGOTO Curitiba e Maringá*	24,99	24,99 + 2,81/m3
ÁGUA E ESGOTO Curitiba e Maringá*	54,39	54,39 + 6,12/m3
ESGOTO Demais Localidades	23,52	23,52 + 2,65/m3
ÁGUA E ESGOTO Demais Localidades	52,92	52,92 + 5,96/m3

Obs: Para os consumos superiores a 10 m3 por economia, nos municípios abastecidos pelos sistemas dos balneários de Pontal do Paraná, Guaratuba e de Matinhos, a tarifa será majorada em 20% (vinte por cento) nos meses de JANEIRO, FEVEREIRO, MARÇO E DEZEMBRO, e minorada em igual percentual nos meses de ABRIL a NOVEMBRO.

(*) Conforme acordo firmado entre o Governo do Estado do Paraná – SANEPAR e o município de Maringá, a tarifa de esgoto passa a ser de 80%, a partir de 01/06/05.

TARIFA DE ÁGUA E ESGOTO PARA ENTIDADE FILANTRÓPICA: DESCONTO DE 50% NO EXCEDENTE A 10M3 DA CATEGORIA UTILIDADE PÚBLICA.
TARIFA DE ÁGUA SOCIAL: 30,58% DA TARIFA RESIDENCIAL.
CONTAS VENCÍVEIS A PARTIR DE: 01 DE FEVEREIRO DE 2005
MULTA = 2% + CORREÇÃO MONETÁRIA PARA CONTAS VENCIDAS HÁ MAIS DE 30 DIAS.
REAJUSTE AUTORIZADO PELO DECRETO ESTADUAL Nº 4266 de 31 de janeiro de 2005

APÊNDICE 1

Para calcular a reprodutibilidade dos experimentos 1 e 2 foi desenvolvido a seguinte linguagem de programação.

Comandos utilizados na análise dos dados:

```
#Análise de dados#
#definindo diretório de analise
setwd ("Y:/analises/maria_judite/")
#lendo os dados
library (XL Connect)
dados<- read Worksheet (load Work book ("dados.xlsx"),sheet=1)

#Comparando experimento 1 e 2
par(mfrow=c(1,2))
boxplot (dados$lipídeos [dados$experimento==1], main= “Lipídeos - Experimento 1", ylab= “mg.L-1", outline=F)
boxplot (dados$lipídeos [dados$experimento==2], main= “Lipídeos - Experimento 2", ylab= “mg.L-1", outline=F)
par (mfrow=c(1,2))
boxplot (dados$biomassa [dados$experimento==1], main= “Biomassa - Experimento 1", ylab= “mg.L-1", outline=F)
boxplot (dados$biomassa [dados$experimento==2], main= “Biomassa - Experimento 2", ylab= “mg.L-1", outline=F)

#Comparando os reciclos
#Lipídeos
lip1 = dados$lipídeos [dados$reciclo==1 &dados$experimento==1 &dados$meio== “clarificado"]
lip2 = dados$lipídeos [dados$reciclo==2 &dados$experimento==1 &dados$meio== “clarificado"]
```

```
lip3 = dados$lipídeos [dados$reciclo==3 &dados$experimento==1 &dados$meio==
“clarificado"]
lip4 = dados$lipídeos [dados$reciclo==1 &dados$experimento==2 &dados$meio==
“clarificado"]
lip5 = dados$lipídeos [dados$reciclo==2 &dados$experimento==2 &dados$meio==
“clarificado"]
lip6 = dados$lipídeos [dados$reciclo==3 &dados$experimento==2 &dados$meio==
“clarificado"]
boxplot (lip1, lip2, lip3, lip4, lip5, lip6)
kruskal.test (dados$lipídeos [dados$meio == "clarificado"] ~ dados$reciclo
[dados$meio == "clarificado"], data=dados)
library ("pgirmess")
kruskalmc (dados$lipídeos [dados$meio == "clarificado"], dados$reciclo [dados$meio
== "clarificado"])

#biomassa
bio1 = dados$biomassa [dados$reciclo==1 &dados$experimento==1
&dados$meio== “clarificado"]
bio2 = dados$biomassa [dados$reciclo==2 &dados$experimento==1
&dados$meio== “clarificado"]
bio3 = dados$biomassa [dados$reciclo==3 &dados$experimento==1
&dados$meio== “clarificado"]
bio4 = dados$biomassa [dados$reciclo==1 &dados$experimento==2
&dados$meio== “clarificado"]
bio5 = dados$biomassa [dados$reciclo==2 &dados$experimento==2
&dados$meio== “clarificado"]
bio6 = dados$biomassa [dados$reciclo==3 &dados$experimento==2
&dados$meio== “clarificado"]
boxplot (bio1, bio2, bio3, bio4, bio5, bio6)
kruskal.test (dados$biomassa [dados$meio == "clarificado"] ~ dados$reciclo
[dados$meio == "clarificado"], data=dados)
library ("pgirmess")
kruskalmc (dados$biomassa [dados$meio == "clarificado"], dados$reciclo
[dados$meio == "clarificado"])
```

```
#Comparando a reprodutibilidade dos experimentos

#lipídeos
exp1 = dados$lipídeos [dados$experimento==1 &dados$meio== “clarificado"]
exp2 = dados$lipídeos [dados$experimento==2 &dados$meio== “clarificado"]
boxplot (exp1, exp2)
wilcox.test (exp1, exp2)

#biomassa
exp1 = dados$biomassa [dados$experimento==1 &dados$meio== “clarificado"]
exp2 = dados$biomassa [dados$experimento==2 &dados$meio== “clarificado"]
boxplot (exp1,exp2)
wilcox.test (exp1, exp2)
```